

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

**Адрес редакции:**

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

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Сайт: www.pfiet.ru

Зав. редакцией Н.Р. Соболев  
+7 906 793 5467

Издатель: Иришкин Дмитрий  
E-mail: genius-me dia@mail.ru

Входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК России для публикации значимых результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

Двухлетний импакт-фактор  
по версии РИНЦ на 2021 г.: 0,513

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

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

Сдано в набор 06.12.2023  
Подписано к печати 14.12.2023  
Опубликовано 27.12.2023

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 № 4. 1–108.

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 № 4 · 2023  
Октябрь–Декабрь

**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 tech-  
nology and mass Federal Service for  
Supervision in the Sphere of Telecom  
and Information Technologies and  
Mass Communications (Roskomnadzor)**

**Mailing address:**

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

**E-mail:** path.physiol@yandex.ru

**Home page:** www.pfiet.ru

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

**Publisher:** Dmitry Irishkin

**E-mail:** genius-media@mail.ru

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

Two-year impact factor  
according to RSCI on 2021 was 0,513

Subscription Index in «Rospechat»: 71456  
Subscription Index in «Ural Press»: 71456

Publication format: 205 × 265 mm  
Printing: Digital Circulation: 300 copies  
The price is not fixed

Sent into set on 06.12.2023  
Signed for publication on 14.12.2023  
Published on 27.12.2023

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 4. 1-108.

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 Pathophysiologicalists

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 № 4 · 2023**

**October–December**

**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*

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.** Половые различия возрастных изменений функциональной активности и экспрессии MaxiK каналов в аорте и сердце крыс . . . . . 4
- Метёлкин А.А., Сергеева Е.А., Попов М.А., Соколовская А.А., Зыбин Д.И., Шумаков Д.В.** Исследование маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов до и после операции реваскуляризации миокарда . . . . . 13
- Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Салимгареева М.Х., Громенко Р.И., Галимов Ш.Н., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Литвицкий П.Ф.** Ассоциация фрагментации ДНК с кинетическими параметрами сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием . . . . . 22
- Колюбаева С.Н., Мякошина Л.А., Нестерова В.А., Богданов Д.С., Чирский В.С., Глушаков Р.И.** Роль полиморфизма некоторых генов в развитии заболевания COVID-19 . . . . . 29
- Сумеркина В.А., Головнева Е.С., Телешева Л.Ф.** Роль нарушений гемостаза и гуморального иммунитета в развитии метаболического синдрома у лиц молодого возраста . . . . . 36
- Митюкова Т.А., Кузнецова Т.Е., Басалай А.А., Чудилова Е.Н., Полулях О.Е., Щербakov Я.В., Хрусталёва Т.А.** Морфологические и функциональные характеристики щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и его коррекции у крыс самцов Вистар . . . . . 47
- Остапенко О.В., Макалиш Т.П., Оберемок В.В., Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Юрченко К.А., Челкак Е.В., Галышевская А.А., Серебрякова А.В.** Изменение структуры органов пищеварения при инфицировании SARS-Cov-2 (экспериментальное исследование) . . . . . 56
- Кузнецов Ю.С., Дурлештер В.М., Маркин В.В., Мирцхулава Н.Г., Крячко А.А., Щупляк С.В., Мурашко Д.С., Рудько В.А.** Пневмомедиастинум как предиктор негативного прогноза у больных с коронавирусной пневмонией . . . . . 66

### ОБЗОРЫ

- Быков Ю.В.** Дисфункция мелатонинергической системы в патогенезе сахарного диабета . . . . . 73
- Московцев А.А., Зайченко Д.М., Иванов П.К., Солопова О.Н.** Клеточный стресс, старение и канцерогенез . . . . . 79
- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.** Язык как орган анализа . . . . . 86
- Зайченко Д.М., Кубатиев А.А., Москалев А.А., Московцев А.А.** Стресс эндоплазматического ретикулума, внеклеточный протеостаз и врожденный иммунитет в патогенезе возрастзависимых заболеваний: болезнь Альцгеймера . . . . . 93

### ХРОНИКА

- Кубышкин А.В., Бoleвич С.Б., Чурилов Л.П., Яковлевич В., Коваленко Е.П., Коровин А.Е.** Новые механизмы и тренды изучения патологических процессов. Информация о IX Конгрессе Международного общества по патофизиологии (ISP2023) . . . . . 103
- Давыдова Т.В.** Объединенный пленум Российского научного общества патофизиологов и Санкт-Петербургского общества патофизиологов . . . . . 107

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLE

- Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F.** Sex differences in age-related changes in the functional activity and expression of MaxiK channels in rat aorta and heart . . . . . 4
- Metelkin A.A., Sergeeva E.A., Popov M.A., Sokolovskaya A.A., Zybin D.I., Shumakov D.V.** Evaluation of platelet apoptosis markers in patients before and after myocardial revascularization . . . . . 13
- Gromenko I.D., Galimova E.F., Salimgareeva M.Kh., Gromenko R.I., Galimov Sh.N., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Litvitskiy P.F.** Association of DNA fragmentation with kinetic parameters of spermatozoa in men with idiopathic infertility . . . . . 22
- Kolyubaeva S.N., Myakoshina L.A., Nesterova V.A., Bogdanov D.S., Chirsky V.S., Glushakov R.I.** The role of some genetic polymorphisms in development of COVID-19 . . . . . 29
- Sumerkina V.A., Golovneva E.S., Telesheva L.F.** The role of disordered hemostasis and humoral immunity in the development of metabolic syndrome in young adults . . . . . 36
- Mityukova T.A., Kuznetsova T.E., Basalai A.A., Chudilovskaya E.N., Poluliakh O.Y., Shcherbakov Ya.V., Khrustaleva T.A.** Morphological and functional characteristics of the thyroid gland in diet-induced obesity and its correction in male Wistar rats . . . . . 47
- Ostapenko O.V., Makalish T.P., Oberemok V.V., Zyablitskaya E.Yu., Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Yurchenko K.A., Chelkak E.V., Galyshevskaya A.A., Serebryakova A.V.** Changes in the structure of the digestive organs during SARS-Cov-2 infection (experimental study) . . . . . 56
- Kuznetsov Y.S., Durlshter V.M., Markin V.V., Mircxylava N.G., Krachko A.A., Shyplak S.V., Murashko D.S., Rudko V.A.** Pneumomediastinum as a predictor of adverse outcome in patients with coronavirus pneumonia . . . . . 66

### REVIEWS

- Bykov Yu.V.** Dysfunction of the melatonergic system in the pathogenesis of diabetes mellitus . . . . . 73
- Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M., Ivanov P.K., Solopova O.N.** Cellular stress, aging and carcinogenesis . . . . . 79
- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.** Language as an organ of analysis . . . . . 86
- Zaichenko D.M., Kubatiev A.A., Moskaev A.A., Moskovtsev A.A.** Endoplasmic reticulum stress, control of extracellular proteostasis, and innate immunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease . . . . . 93

### CHRONICLE

- Kubyshkin A.V., Bolevich S.B., Churilov L.P., Jakovljevich V., Kovalenko E.P., Korovin A.E.** New Mechanisms and Trends of the Pathological Processes Research (Information about 9<sup>th</sup> International Congress of the International Society for Pathophysiology (ISP2023) . . . . . 103
- Davydova T.V.** Joint Plenum of the Russian Scientific Society of Pathophysiology and St. Petersburg Society of Pathophysiology . . . . . 107

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.

### Половые различия возрастных изменений функциональной активности и экспрессии *MaxiK* каналов в аорте и сердце крыс

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

Старение является доминирующим фактором риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, которые остаются основной причиной смерти в мире.  $Ca^{2+}$ -активируемые потенциалзависимые калиевые каналы большой проводимости (*MaxiK*) играют важную роль в поддержании тонуса сосудов и регуляции сократительной функции миокарда. С нарушением функции *MaxiK* связывают аномальное расслабление или сокращение сосудов, а также нарушение сердечного ритма. Однако влияние старения на функцию *MaxiK* и их вклад в развитие возраст-ассоциированных заболеваний неясны. Большинство исследований проводятся на мелких резистивных сосудах старых животных, в то время как в старости большую роль в регуляции системного артериального давления приобретают магистральные сосуды. Отсутствуют данные о половых особенностях возрастных изменений свойств этих каналов. **Цель исследования** – оценка влияния возраста и пола животных на функциональную активность и экспрессию  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц *MaxiK* каналов в аорте и сердце.

**Методика.** Исследования проводили на молодых (3 мес) и возрастных (18 мес) крысах самцах и самках. Силу сокращения изолированных фрагментов грудного отдела аорты измеряли в изометрическом режиме на проволочном четырехканальном миографе (Danish Myo Technology, модель Multi Myograph System – 620M). Экспрессию генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcna1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц *MaxiK* канала в аорте и в различных отделах сердца оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ).

**Результаты.** Инкубация сосудов с блокатором *MaxiK* ибериотоксином (100 нМ) в течение 30 мин приводила к усилению сократительной реакции аорты крыс в ответ на воздействие возрастающих доз серотонина ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М) только у молодых половозрелых крыс обоего пола (3 мес), что проявлялось в сдвиге зависимости «концентрация-эффект» влево. У старых крыс, как в присутствии, так и в отсутствие ибериотоксина в равной мере возрастает чувствительность сосудов к вазоконстрикторному действию серотонина, что свидетельствует об утрате в стареющих сосудах защитного механизма отрицательной обратной связи, реализуемого *MaxiK*. В аорте старых самцов уровень экспрессии генов  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц канала оставался неизменным. В аорте старых самок выявлено снижение на 45% содержания мРНК  $\beta$  субъединицы *MaxiK* канала. Установлено, что у крыс обоего пола в левом желудочке экспрессия гена порообразующей  $\alpha$  субъединицы возрастает более чем в два раза. Экспрессия гена регуляторной  $\beta$  субъединицы снижается в 1,4 и 1,6 раза у самцов и самок соответственно. Предполагается, что нарушение нормального (1:1) соотношения между  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицами *MaxiK* может провоцировать возникновение желудочковых аритмий в старости. Преобладание экспрессии  $\alpha$  субъединицы канала выявлено в правом предсердии старых крыс самцов. Напротив, в левом предсердии старых крыс обоего пола и в правом у самок значительно преобладает экспрессия гена *Kcnmb4* над *Kcna1*.

**Заключение.** В процессе старения в аорте крыс самцов и самок нивелируется важнейший механизм отрицательной обратной связи, реализуемый *MaxiK* каналами в ответ на воздействие эндогенных вазоконстрикторов, что может быть одним из факторов риска развития гипертонии в старости. Дисбаланс в уровнях экспрессии  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц *MaxiK* в различных отделах стареющего сердца может отрицательно влиять на сократительную функцию кардиомиоцитов и сердечный ритм. Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии старения на свойства *MaxiK* каналов, локализованных в магистральных сосудах и сердце крыс самцов и самок. *MaxiK* могут быть потенциальными мишенями для фармакологической модуляции возраст-ассоциированной гипертонии и нарушений сердечного ритма.

**Ключевые слова:** старение; половой диморфизм; сократимость; аорта; миокард; калиевые каналы; экспрессия; *MaxiK*

**Для цитирования:** Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Половые различия возрастных изменений функциональной активности и экспрессии *MaxiK* каналов в аорте и сердце крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 4-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.4-12

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, написание текста – Кожевникова Л.М.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Суханова И.Ф.; редактирование – Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

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

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.10. 2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

**Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F.**

## Sex differences in age-related changes in the functional activity and expression of MaxiK channels in rat aorta and heart

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

Aging is a dominant risk factor of cardiovascular diseases that remain the leading cause of death worldwide. Ca<sup>2+</sup>-activated voltage-gated large conductance potassium channels (MaxiK) play an important role in maintaining vascular tone and myocardial contractility. Impaired MaxiK function is associated with disordered vascular relaxation or contraction and heart rhythm. However, the effects of aging on the MaxiK function and the MaxiK contribution to the development of age-associated diseases are unclear. Most studies have been performed on small resistance blood vessels of old animals while in old age, great vessels take on a greater role in the regulation of systemic blood pressure. Data on gender-related changes in MaxiK properties are not available. **The aim of the study** was to assess the effect of age and sex of animals on the functioning and expression of MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the aorta and heart.

**Methods.** The study was performed on young (3 months) and aged (18 months) male and female rats. The contraction force of isolated fragments of the thoracic aorta was measured in the isometric mode on a wire four-channel myograph (620M Multi Myograph System, Danish Myo Technology). Gene expression of the pore-forming  $\alpha$  (*Kcnma1*) and regulatory  $\beta$  (*Kcnmb4*) subunits of the MaxiK channel was assessed in the aorta and various parts of the heart using the quantitative polymerase chain reaction (PCR analysis).

**Results.** Incubation of blood vessels with the MaxiK blocker, iberiotoxin (100 nM), for 30 min increased the contractile reaction of the rat aorta to increasing doses of serotonin ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) only in young, sexually mature (3 months old) rats of either sex, which was evident in a shift of the concentration-effect curve to the left. In old rats, both in the presence and absence of iberiotoxin, the sensitivity of blood vessels to the vasoconstrictor effect of serotonin equally increased, which indicated the loss of the negative feedback protective mechanism mediated by MaxiK in aging blood vessels. In the aorta of old males, the level of gene expression of MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits remained unchanged. In the aorta of old females, MaxiK  $\beta$  subunit mRNA was decreased by 45%. In the left ventricle of rats of either sex, the pore-forming  $\alpha$  subunit gene expression was more than twofold increased. The regulatory  $\beta$  subunit gene expression was reduced by 1.4 and 1.6 times in males and females, respectively. The data suggested that the disruption of the normal 1:1 ratio between the MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits may provoke ventricular arrhythmias in old age. The MaxiK  $\alpha$  subunit expression predominated in the right atrium of old male rats. On the contrary, in the left atrium of old rats of either sex and in the right atrium of females, the *Kcnmb4* gene expression significantly predominated over the *Kcnma1* gene expression.

**Conclusion.** During the aging of the aorta of male and female rats, the essential negative feedback response of MaxiK channels to endogenous vasoconstrictors attenuates, which may be a risk factor for the development of hypertension in old age. Imbalanced expression of the MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in different compartments of the aging heart may adversely affect the cardiomyocyte contractility and heart rhythm. The results of the study indicate a negative effect of aging on the properties of MaxiK channels localized in the great vessels and heart of male and female rats. Thus, MaxiK may be a potential target for pharmacological modulation of age-associated hypertension and cardiac arrhythmias.

**Keywords:** aging; sexual dimorphism; aortic contractility; myocardium; potassium channels; expression; MaxiK

**For citation:** Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F. Sex differences in age-related changes in the functional activity and expression of MaxiK channels in the aorta and heart of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 4-12. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.4-12

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

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

**Information about the authors:**Kozhevnikova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>Sukhanova I.F., <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

Received 12.10.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

**Введение**

Частота сердечно-сосудистых заболеваний увеличивается с возрастом из-за резкого снижения адаптивных механизмов и повышенной уязвимости сосудов и миокарда к воздействию эндогенных и экзогенных факторов. Существенный вклад в регуляцию миогенного тонуса сосудов и сократимости миокарда вносят ионные каналы. Большое значение в регуляции сократительной активности сосудов и миокарда имеют калиевые каналы [1-3].  $\text{Ca}^{2+}$ - и потенциал чувствительные калиевые каналы большой проводимости (MaxiK или  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ ) играют важную роль в формировании возбудимости мышц и нейронов. MaxiK характеризуются высокой  $\text{K}^+$ -селективностью, большой канальной проводимостью и способностью к двойной активации двумя различными физиологическими стимулами: деполяризацией мембраны и локальным увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Стимуляция MaxiK каналов сопровождается быстрым оттоком ионов калия и гиперполяризацией мембраны, что является важнейшим физиологическим механизмом модуляции возбудимости мембран и внутриклеточного гомеостаза ионов кальция [4].

MaxiK каналы представляют собой трансмембранные белки, состоящие из двух нековалентно связанных субъединиц: порообразующей  $\alpha$  субъединицы (четыре  $\alpha$  субъединицы образуют пору канала) и регуляторной  $\beta$ 1 субъединицы [2, 5]. Хотя  $\alpha$  субъединица отвечает за основную функцию ионного потока MaxiK каналов, регуляторная  $\beta$ 1 субъединица значительно влияет на проводимость канала, изменяя его кинетику, чувствительность к напряжению/ $\text{Ca}^{2+}$  и фармакологию [6, 7].

В сердечно-сосудистой системе MaxiK каналы способствуют расслаблению сосудов и защищают миокард от ишемического повреждения [3, 6]. Дисфункция MaxiK приводит к нарушению сердечного ритма, развитию гипертензии и ряда других заболеваний [2, 8, 9].

До настоящего времени остаются неясными характер и механизмы изменения свойств MaxiK каналов в стареющих сосудах и миокарде, как и нет четкого представления об их причастности к развитию возраст-ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний. Показано, что в миоцитах мозговой артерии

стареющих крыс сохраняется нормальная экспрессия MaxiK, плотность тока ионов, кинетика и чувствительность каналов к  $\text{Ca}^{2+}$ , а также к активирующим соединениям [3]. В стареющих коронарных артериях, напротив, снижается экспрессия MaxiK каналов [5]. С возрастом снижается чувствительность MaxiK в брыжеечной артерии к  $\text{Ca}^{2+}$ /напряжению, падает экспрессия этих каналов [3]. Влияние старения на экспрессию и функцию MaxiK каналов во многом зависит от типа сосудов. Следует отметить, что все исследования проведены на резистивных сосудах самцов.

Физиологические эффекты и механизмы старения магистральных сосудов, в том числе изменения их чувствительности по отношению к вазоактивным соединениям, изучены недостаточно. Важная функция аорты заключается в том, чтобы гасить повышение давления, вызванного выбросом крови из левого желудочка во время систолы. Потеря данной функции приводит к увеличению систолического давления и к нагрузке на левый желудочек сердца. Все это способствует развитию гипертензии, гипертрофии левого желудочка, субэндокардиальной ишемии и фиброза миокарда [10, 11].

В сердце MaxiK каналы локализованы во внутренней митохондриальной мембране кардиомиоцитов. Каналы mitoMaxiK играют важную роль в защите сердца от повреждающего действия ишемии/реперфузии. Механизм кардиопротекции связывают с модуляцией уровней митохондриального кальция, активных форм кислорода и мембранного потенциала [12, 13]. Имеются данные об участии mitoMaxiK в регуляции сердечного ритма и причастности к развитию аритмий [8, 14].

До настоящего времени не изучено влияние пола на возрастные изменения функциональной активности и экспрессии MaxiK каналов в магистральных сосудах и сердце. В данной работе для понимания вклада MaxiK каналов в развитие возраст-ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний мы оценили влияние возраста и пола на функциональную активность и экспрессию генов  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц MaxiK канала в аорте и сердце крыс.

### Методика

Эксперименты выполнены на крысах породы Вистар. Содержание лабораторных животных и эксперименты проводили в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте, и требованиями Директивы Совета ЕС «О сближении законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (86/609/ЕЕС), национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Этического комитета института общей патологии и патофизиологии, и было утверждено Комитетом по этике (протокол утверждения проекта № 5 от 7 июня 2019 г.; протокол окончательного утверждения № 1а от 2 октября, 2020 г.).

**Физиологические методы исследования.** Исследования проводили на крысах самцах и самках в возрасте 3 (молодые:  $n = 15$  для самцов,  $n = 12$  для самок) и 18 мес (пожилые:  $n = 15$  для самцов,  $n = 12$  для самок). Анестезированных крыс (25% раствор уретана, 4 мл/кг) декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и сердце. Аорту помещали в раствор Кребса-Хенселейта, охлажденный до  $+4^{\circ}\text{C}$ , очищали и нарезали на кольца шириной 1,5–2,2 мм. Силу сокращения сосудов измеряли в изометрическом режиме на проволочном четырехканальном миографе (DanishMyo Technology, модель Multi Myograph System – 620M). Для этого кольца аорты крепили на держателях, помещенных в раствор Кребса-Хенселейта, аэрируемый карбогеном (5%  $\text{CO}_2$  в  $\text{O}_2$ ). Состав раствора Кребса-Хенселейта в мМ:  $\text{NaCl} - 121$ ;  $\text{KCl} - 4.69$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.1$ ;  $\text{NaHCO}_3 - 23.8$ ;  $\text{MgSO}_4 - 1.6$ ;  $\text{CaCl}_2 - 1.6$ ; ЭДТА – 0.032; D-глюкоза – 8. После достижения в камерах миографа температуры раствора  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  фрагменты аорты растягивали радиально до оптимального диаметра просвета, соответствующего 90% пассивного диаметра сосуда при 100 мм Hg. После процедуры растяжения и последующего периода стабилизации в течение 40 мин жизнеспособность сосудов проверяли с помощью 0,1 мкМ норадреналина – агониста адренорецепторов (Sigma, США). Сохранность эндотелия тестировали с помощью агониста мускариновых рецепторов (10 мкМ карбахола, Sigma, США). В экспериментах на изолированных сосудах использовали агонист 5HT<sub>2</sub>R рецепторов серотонин (Sigma, США) и селективный блокатор MaxiK каналов ибериотоксин (Tocris, Англия).

**Молекулярно-биологические методы исследования.**  
**Выделение РНК.** Образцы тканей предсердий, левого желудочка и аорты помещали в раствор RNeasy (Ambion, США) и хранили до выделения РНК при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ткани измельчали в жидком азоте. Экстракцию РНК проводили с использованием набора GeneJET™ (ThermoFisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Выделенную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США) для предотвращения загрязнения геномной ДНК. Концентрацию тотальной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для проведения реакции обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя, используя случайные гексамерные праймеры.

Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя праймеров. Праймеры для реакции были подобраны, синтезированы и валидированы ООО «ДНК-Синтез» (Россия) (табл.). ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 Cyler-RealTime PCR Detection System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, США) в 96-луночной планшете, в объеме 20 мкл, используя 1 мкл кДНК. Все эксперименты включали отрицательный контроль. Для нормализации уровней экспрессии генов использовали  $\beta$ -актин. Различия в экспрессии целевого гена оценивали по изменению соотношения уровней мРНК гена/мРНК  $\beta$ -актина. Результаты обрабатывали в Microsoft Excel с использованием алгоритма  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 8. Для сравнения средних значений и статистических различий между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Данные в тексте представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Расхождения считались значимыми при  $p < 0.05$ .

### Результаты

В работе оценивали влияние блокатора MaxiK каналов ибериотоксина на силу сокращения колец аорты в ответ на воздействие серотонина (5HT). Серотонин был выбран не случайно, поскольку ранее выявлено значительное повышение чувствительности сосудов старых животных к моноамину [15]. Причастность MaxiK каналов к развитию данного феномена

ранее не изучалась. Установлено, что предварительная инкубация сосудов с ибериотоксином в концентрации 100 нМ не влияла на базальный тонус сосудов молодых и пожилых крыс обоего пола. Блокатор калиевых каналов приводил к значительному усилению сократительной реакции колец аорты молодых самцов в ответ на воздействие серотонина, о чем свидетельствует смещение зависимости «концентрация-эффект» влево (рис. 1, А). Влияние ибериотоксина на 5HT-индуцированное сокращение изолированных фрагментов аорты молодых самок было менее выраженным, чем у самцов. По сравнению с контролем

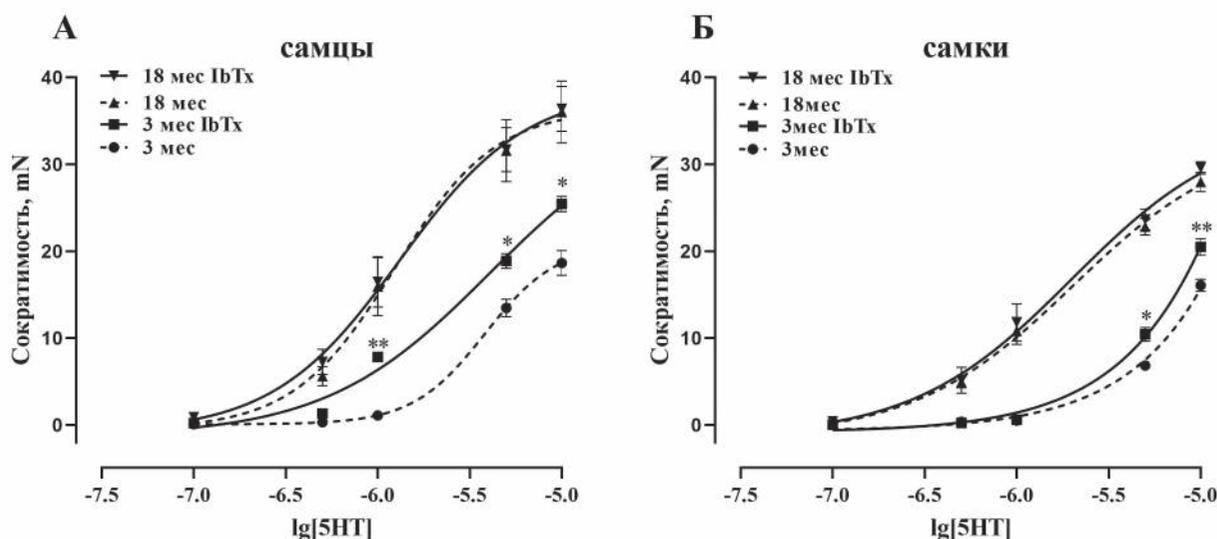
в присутствии ибериотоксина сила сокращения сосудов молодых самок была статистически значимо выше только при добавлении моноамина в высоких концентрациях (рис. 1, Б).

С возрастом как у самцов, так и у самок возрастает чувствительность сосудов к действию 5HT. Сила сокращения сосудов возрастных животных обоего пола в ответ на воздействие серотонина после их инкубации с ибериотоксином была сопоставимой с реакцией сосудов в отсутствие блокатора MaxiK (рис. 1, А, Б). Это свидетельствует о том, что в стареющих сосудах снижена функциональная активность MaxiK каналов.

**Последовательности праймеров, используемых в работе**

**Sequences of primers used in this work**

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Праймер с флуоресцентным зондом
<i>Actb</i> (β-актин)	CTGACAGGATGCAGAAG-GAG	GATAGAGCCACCAATCCAC	FAM-CAAGATCATTGCTCCTCCT-GAGC-BHQ1
<i>Kcna1</i> (α субъединица MaxiK)	CTCAGCATGGTGC-CCTT	GCCATGTCGATCTGTAATGTGA	FAM-CTCATCAAC-CCAATAGAATCCTGCC-BHQ1
<i>Kcna4</i> (β субъединица MaxiK)	GACCAGCACCAGCTCCT	GACACTTCCGAGTTCTTCTGG	FAM-CCAAGTGCTCCTATATCCCGCCC-BHQ1



**Рис. 1.** Зависимости «концентрация-эффект» на 5-HT-индуцированное сокращение аорты в присутствии и отсутствии блокатора MaxiK каналов ибериотоксина (IbTx, 100 нМ) у крыс самцов (А) и самок (Б) разного возраста (3 и 18 мес). \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01 – сравнение между группами 3 мес крыс в присутствии и в отсутствие ибериотоксина.

**Fig. 1.** «Dose-response» relationship on 5-HT-induced aortic contraction in the presence and absence of the MaxiK channel blocker iberiotoxin (IbTx, 100 nM) in male (A) and female (B) rats of different ages (3 and 18 months). \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01 – comparison between groups of 3-month-old rats in the presence and absence of iberiotoxin.

Как показано на **рис. 2**, с возрастом экспрессия генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц MaxiK каналов в аорте самцов не изменяется, в то время как у самок наблюдается значительное снижение уровня мРНК  $\beta$  MaxiK.

В работе также оценивали содержание мРНК *MaxiK* каналов в различных отделах сердца. В левом желудочке возрастных самцов и самок в 2 и более раза возрастает уровень экспрессии гена *Kcnma1* по сравнению с аналогичным показателем у молодых животных. Экспрессия гена регуляторной субъединицы канала *Kcnmb4* снижается у самцов в 1,4 и у самок в 1,6 раза (**рис. 3, А, Б**).

В левом предсердии возрастных крыс обоего пола, напротив, выявлено значительное снижение уровня мРНК порообразующей  $\alpha$  субъединицы MaxiK каналов (**рис. 3**). Кроме того, у самок в левом предсердии увеличивается экспрессия гена  $\beta$  субъединицы *Kcnmb4*. В правом предсердии у возрастных самцов снижается уровень экспрессии регуляторной  $\beta$  субъединицы, а у самок – порообразующей  $\alpha$  субъединицы MaxiK каналов.

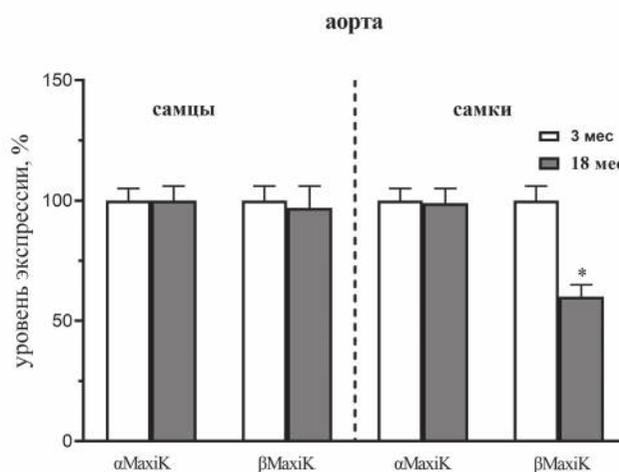
### Обсуждение

Ранее было показано, что с возрастом снижается вклад MaxiK каналов в регуляцию сократимости брыжеечной артерии крыс самцов [5]. Выявлено возраст-ассоциированное снижение экспрессии  $\beta$  субъединицы MaxiK. Авторы полагают, что нарушение работы MaxiK каналов обусловлено изменением соотношения  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц. В гладкомышечных клетках артерий  $\beta$  субъединица является основной функционально вспомогательной субъединицей канала. Считается, что в норме соотношение порообразующих и регуляторных субъединиц MaxiK каналов составляет 1:1. Ассоциация с регуляторными  $\beta$  субъединицами приводит к увеличению кальций- и потенциал чувствительности  $\alpha$  субъединиц, влияет на кинетику и фармакологию канала [16].

Полученные нами данные также указывают на изменение соотношения  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц в аорте пожилых самок, но не самцов. С возрастом функциональная активность каналов в аорте крыс обоего пола нарушается в равной степени, однако, в отличие от самок, в аорте самцов уровни экспрессии генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц остаются неизменными (**рис. 2**). Исходя из этого можно предположить, что угнетение функции MaxiK каналов обусловлено и другими механизмами. Подобную ситуацию наблюдали при изучении причин эректильной дисфункции у пожилых крыс. В процессе старения

в клетках гладких мышц сосудов кавернозных тел пениса (rat corporal smooth muscle cells) уровни мРНК генов порообразующих  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторных  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц остаются неизменными. Однако происходят значительные изменения на уровне образования транскриптов, кодирующих различные сплайс-варианты белков порообразующей  $\alpha$  субъединицы. Альтернативный сплайсинг приводит к нарушению трафика MaxiK каналов из цитоплазмы к мембране и многократному снижению содержания канальных белков в ней [17]. Возможно, в аорте пожилых крыс имеет место наличие функционально неактивных сплайс-вариантов белков MaxiK, что приводит к снижению влияния MaxiK на сократимость аорты при неизменных уровнях экспрессии мРНК генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц. Это предположение требует дальнейших исследований.

Таким образом, с возрастом в магистральных сосудах крыс нивелируется защитный механизм отрица-

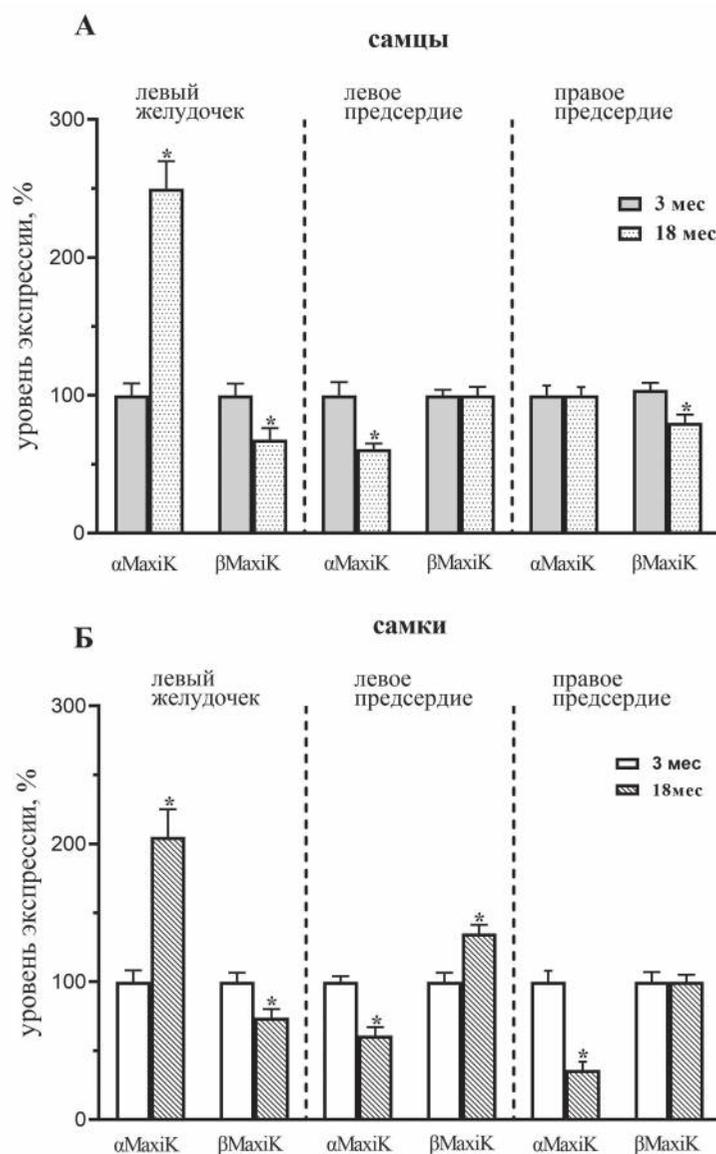


**Рис. 2.** Возрастные изменения уровней мРНК порообразующей (*Kcnma1*) и регуляторной (*Kcnmb4*) субъединиц MaxiK каналов в сосудах самцов и самок крыс. Здесь и далее значения экспрессии для каждого исследуемого гена нормировали на значение экспрессии референсного гена –  $\beta$ -актина в том же образце ткани. Содержание мРНК каждого исследуемого гена выражено в процентах от среднего значения того же гена в группе молодых крыс самцов или самок, принятого за 100%. \* –  $p < 0.01$  по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

**Fig. 2.** Age-related changes in the levels of mRNA of pore-forming (*Kcnma1*) and regulatory (*Kcnmb4*) subunits of the MaxiK channel in the vessels of male and female rats. Here and further, the expression values for each studied gene were normalized to the expression value of the reference gene –  $\beta$ -actin in the same tissue sample. The mRNA content of each studied gene is expressed as a percentage of the average value of the same gene in a group of young male or female rats, taken as 100%. \* –  $p < 0.01$  compared to rats aged 3 months.

тельной обратной связи в ответ на действие вазоконстрикторов, реализуемый MaxiK каналами в сосудах молодых животных. Возрастное угнетение данного механизма в сосудах может быть одним из факторов риска развития артериальной гипертензии. Можно предположить, что активация MaxiK каналов при гипертензии у лиц пожилого возраста с помощью фармакологических средств будет способствовать нормализации артериального давления.

С возрастом повышается уязвимость миокарда к воздействию неблагоприятных факторов, что приводит к нарушению функции кардиомиоцитов. Функциональное разнообразие MaxiK каналов, благодаря большому количеству сплайс-вариантов и множеству комбинаций, направлено на обеспечение нужд клеток, в которых они экспрессируются. MaxiK каналы во взрослых кардиомиоцитах располагаются не в плазматической мембране, а во внутренней ми-



**Рис. 3.** Влияние возраста на уровень мРНК генов порообразующей (*Kcna1*) и регуляторной (*Kcnmb4*) субъединиц MaxiK канала в левом желудочке и предсердиях крыс самцов и самок.

**Fig. 3.** The influence of age on the mRNA level of the pore-forming (*Kcna1*) and regulatory (*Kcnmb4*) subunits of the MaxiK channelsubunits in the left ventricle and atria of male and female rats.

тохондриальной мембране [2]. Митохондриальный канал (mitoMaxiK) представляет собой сплайсинговый вариант канала плазматической мембраны [18]. Активность mitoMaxiK каналов увеличивает проводимость  $K^+$  и улучшает дыхательную функцию митохондрий. Открытие mitoMaxiK приводит к снижению продукции активных форм кислорода и чрезмерной концентрации внутримитохондриального  $Ca^{2+}$ , играя важную роль в защите сердца от повреждающего действия ишемии/реперфузии. Ранее было показано, что активация mitoMaxiK с помощью фармакологических средств оказывает кардиопротекторное действие при ишемическом/реперфузионном повреждении, как у молодых, так и возрастных крыс [12, 13]. Полагают, что фармакологическое воздействие на MaxiK каналы до или после ишемии миокарда является перспективной терапевтической стратегией для защиты стареющего сердца от ишемического и реперфузионного повреждения.

В последние годы накапливается все больше данных о причастности сердечных MaxiK к развитию аритмий [8, 14]. Нами установлено, что в стареющем сердце крыс наиболее глубокие нарушения отмечены в левом желудочке, которые проявлялись в значительном росте экспрессии генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и снижении регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb*) субъединиц MaxiK каналов. Значительное преобладание экспрессии  $\alpha$  субъединицы над  $\beta$  субъединицей свидетельствует о нарушении баланса между субъединицами (приблизительно 3:1 судя по уровню их мРНК), вследствие чего могут изменяться физико-химические характеристики и функциональная активность каналов.

Показано, что ингибиторы MaxiK каналов значительно снижают частоту сердечных сокращений у мышей дикого типа, но не влияют на сердечный ритм мышей с нокаутом *Kcnma1*(-/-) канала [19, 20]. В то время как у мышей с нокаутом *b1* и *b1/b4* субъединиц (*Kcnmb12/2* и *Kcnmb1b42/2* соответственно) блокатор MaxiK каналов паксиллин не оказывал влияния на частоту сердечных сокращений. Доказана определяющая роль  $\alpha$  субъединицы MaxiK канала в регуляции сердечного ритма [19]. С учетом данных литературы можно предложить, что значительное увеличение экспрессии гена порообразующей  $\alpha$  субъединицы (*Kcnma1*) MaxiK в левом желудочке возрастных крыс обоего пола является фактором риска возникновения в старости желудочковых аритмий в результате нарушения проведения волн возбуждения по сократительным кардиомиоцитам.

Только у старых самцов в правом предсердии, как и в левом желудочке, уменьшается экспрессия гена  $\beta$

субъединицы и изменяется соотношение между порообразующими и регуляторными белками с преобладанием  $\alpha$  субъединицы, что также может приводить к изменению активности MaxiK канала. В стенке правого предсердия расположен синоатриальный узел, в котором выявлен наибольший уровень экспрессии  $\alpha$  субъединиц канала по сравнению с другими отделами сердца [14]. Показано, что нарушение функции MaxiK в синоатриальном узле может провоцировать развитие предсердных аритмий [14, 20]. Авторы полагают, что MaxiK каналы являются потенциальными терапевтическими мишенями при нарушениях сердечного ритма и сократимости сердца.

Нарушение баланса между субъединицами MaxiK канала отмечено и в левом предсердии крыс, но в отличие от желудочков и правого предсердия в них наблюдается сдвиг соотношения в сторону преобладания  $\beta$  субъединиц (рис. 3). Аналогичные изменения выявлены и в правом предсердии стареющих самок. Пока не понятно, каким образом они могут повлиять на функциональную активность каналов и отразиться на сократительной функции сердца стареющих крыс. С учетом данных литературы MaxiK каналы можно рассматривать в качестве потенциальных мишеней для модуляции частоты сердечных сокращений и сократимости при ишемических повреждениях в процессе старения.

### Заключение

Наши результаты впервые демонстрируют, что возрастное снижение функциональной активности MaxiK каналов в гладкомышечных клетках аорты может быть одним из механизмов развития гиперчувствительности к действию эндогенных вазоконстрикторов. В частности, в магистральных сосудах стареющих крыс обоего пола утрачивается защитный механизм отрицательной обратной связи, реализуемый MaxiK-каналами в сосудах молодых животных. В левом желудочке стареющего сердца выявлены высокий уровень экспрессии гена  $\alpha$  субъединицы и низкий  $\beta$  субъединицы MaxiK канала, что приводит к значительному сдвигу соотношения между уровнями экспрессии  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц в сторону порообразующей субъединицы. Преобладание  $\alpha$  субъединицы выявлено и в правом предсердии старых самцов. Выявленные изменения могут негативно влиять на сердечный ритм стареющего сердца и выступать в качестве предикторов развития желудочковых и предсердных аритмий. Стоит отметить, что в старости у крыс самцов большая степень риска возникновения предсердных аритмий, чем у самок. Полученные данные

позволяют предположить, что MaxiK каналы могут быть терапевтической мишенью для модуляции возраст-ассоциированных нарушений регуляции тонуса сосудов и частоты сердечных сокращений.

### Литература

#### (п.п. 1-3; 5-14; 16-20 см. References)

4. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Патологическая роль кальций- и потенциалзависимых калиевых каналов большой проводимости (BKCa) и каналов внутреннего выпрямления (Kir) в регуляции сердечно-сосудистой системы. *Патогенез*. 2023; 21(1): 4-15. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2023.01.4-15>
15. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Изменения экспрессии генов серотониновых 5HT2A-R и эндотелиновых ETA-R рецепторов как маркеры раннего старения аорты крысы. *Патогенез*. 2018; 16(3): 94-7. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2018.03.94-97>

### References

1. Thijssen D.H., Carter S.E., Green D.J. Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J Physiol*. 2016; 594(8): 2275-84. doi: 10.1113/JP270597
2. Balderas E., Zhang J., Stefani E., Toro L. Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol*. 2015; 6: 104. doi: 10.3389/fphys.2015.00104 eCollection 2015
3. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol*. 2017; 7(2): 485-581. doi: 10.1002/cphy.c160011
5. Shi L., Liu B., Zhang Y., Xue Z., Liu Y., Chen Y. Exercise training reverses unparallel downregulation of MaxiK channel  $\alpha$ - and  $\beta$ 1-subunit to enhance vascular function in aging mesenteric arteries. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69(12): 1462-73. doi: 10.1093/gerona/glt205
6. Dopico A.M., Bukiya A.N., Jaggar J.H. Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch*. 2018; 470(9): 1271-89. doi: 10.1007/s00424-018-2151-y
7. Sancho M., Kyle B.D. The Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel: A Big Key Regulator of Cell Physiology. *Front Physiol*. 2021; 12: 750615. doi: 10.3389/fphys.2021.750615 eCollection 2021
8. Patel N.H., Johannesen J., Shah K., Goswami S.K., Patel N.J., Ponnalagu D., et al. Inhibition of BKCa negatively alters

- cardiovascular function. *Physiol Rep*. 2018; 6(12): e13748. doi: 10.14814/phy2.13748
9. Guntur D., Olschewski H., Enyedi P., Csáki R., Olschewski A., Nagaraj C. Revisiting the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium (BKCa) Channels in the Pulmonary Circulation. *Biomolecules*. 2021; 11(11): 1629. doi: 10.3390/biom11111629
10. Mazzaro L., Almasi S.J., Shandas R., Seals D.R., Gates P.E. Aortic input impedance increases with age in healthy men and women. *Hypertension*. 2005; 45(6): 1101-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000164579.73656.c4. Epub 2005 May 2
11. Sheydina A., Riordon D.R., Boheler K.R. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 121(8): 315-29. doi: 10.1042/CS20110115
12. Heinen A., Ströthoff M., Schmidt A., Stracke N., Behmenburg F., Bauer I., et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp Gerontol*. 2014; 56: 99-105. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.029
13. Testai L., Da Pozzo E., Piano I., Pistelli L., Gargini C., Breschi M.C., et al. The Citrus Flavanone Naringenin Produces Cardioprotective Effects in Hearts from 1 Year Old Rat, through Activation of mitoBK Channels. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 71. doi: 10.3389/fphar.2017.00071. eCollection 2017
14. Pineda S., Nikolova-Krstevski V., Leimena C., Atkinson A. J., Altekoester A., Cox C. D., et al. Conserved Role of the Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channel, KCa1.1, in Sinus Node Function and Arrhythmia Risk. *Circ Genom Precis Med*. 2021; 14(2): e003144. doi: 10.1161/CIRCGEN.120.003144
16. Toro L., Wallner M., Meera P., Tanaka Y. Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci*. 1998; 112-7. doi: 10.1152/physiologyonline.1998.13.3.112
17. Davies K.P., Stanevsky Y., Tar M.T., Chang J.S., Chance M.R., Melman A. Ageing causes cytoplasmic retention of MaxiK channels in rat corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res*. 2007; 19(4): 371-7. doi: 10.1038/sj.ijir.3901541
18. González-Cota A.L., Santana-Calvo C., Servín-Vences R., Orta G., Balderas E. Regulatory mechanisms of mitochondrial BKCa channels. *Channels (Austin)*. 2021; 15(1): 424-37. doi: 10.1080/19336950.2021.1919463
19. Imlach W.L., Finch S.C., Miller J.H., Meredith A.L., Dalziel J.E. A role for BK channels in heart rate regulation in rodents. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8698. doi: 10.1371/journal.pone.0008698
20. Lai M.H., Wu Y., Gao Z., Anderson M.E., Dalziel J.E., Meredith A.L. BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 307(9): H1327-38. doi: 10.1152/ajpheart.00354.2014

#### Сведения об авторах:

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

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

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

Метёлкин А.А.<sup>1</sup>, Сергеева Е.А.<sup>1</sup>, Попов М.А.<sup>2</sup>, Соколовская А.А.<sup>1</sup>, Зыбин Д.И.<sup>2</sup>, Шумаков Д.В.<sup>2</sup>

## Исследование маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов до и после операции реваскуляризации миокарда

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
125315, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,  
129110, Москва, Россия

**Актуальность.** Сердечно-сосудистые заболевания остаются важнейшей причиной смертности по всему миру. В структуре болезней системы кровообращения главное место занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). Одним из основных методов хирургического лечения ИБС является коронарное шунтирование. Оценка прогноза исходов послеоперационного периода остается сложной задачей. Возможными маркерами для прогнозирования риска неблагоприятных исходов могут стать показатели апоптоза тромбоцитов.

**Цель** исследования – оценка в динамике показателей апоптоза тромбоцитов до операции и в раннем послеоперационном периоде.

**Методика.** В исследование были включены 14 пациентов, которым было выполнено аортокоронарное шунтирование. Образцы крови брали непосредственно до операции, а также через 4-5 сут после операции и исследованы с помощью методов вестерн-блот и проточной цитофлуориметрии. Тромбоциты окрашивали флуоресцентно меченым Аннексином V-FITC, а также обрабатывали антителами к основным белкам, регулирующим процесс апоптоза: BAK, BAX, Cytochrome c, Caspase 3, BCL-2.

**Результаты.** По результатам исследования пациенты продемонстрировали значимое снижение показателей апоптоза тромбоцитов после проведенной операции. Большинство из них показали уменьшение связывания с Аннексином V (84,98%) по сравнению с состоянием до операции, что говорит об уменьшении количества клеток в ранней стадии апоптоза. С помощью метода вестерн-блот было показано снижение уровней основных проапоптотических белков (BAX: 87,76%; BAK: 91,18%), что также указывает на снижение количества тромбоцитов в состоянии апоптоза.

**Заключение.** Данные нашего пилотного исследования свидетельствуют о том, что функциональные параметры тромбоцитов, выявленные у пациентов с ИБС, отличаются от характеристик тромбоцитов у тех же пациентов после реваскуляризации миокарда. Полученные результаты позволяют предположить вовлечение в механизм развития заболевания ИБС метаболизма тромбоцитов, что отражает тяжесть заболевания у пациентов. Необходимы дальнейшие исследования для оценки потенциальной прогностической роли маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов с ИБС.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца; тромбоциты; апоптоз

**Для цитирования:** Метёлкин А.А., Сергеева Е.А., Попов М.А., Соколовская А.А., Зыбин Д.И., Шумаков Д.В. Исследование маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов до и после операции реваскуляризации миокарда. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 13-21.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.13-21

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Соколовская А.А.; обработка материала, проведение исследования, написание и подготовка иллюстративного материала – Метёлкин А.А., Сергеева Е.А.; Попов М.А., Зыбин Д.И., Шумаков Д.В.; обработка результатов – Метёлкин А.А.; сбор и описание материала – Сергеева Е.А., Зыбин Д.И., Метёлкин А.А.; общее руководство исследованием – Соколовская А.А., Попов М.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Метёлкин Аркадий Андреевич, e-mail: armetelkin@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена за счет средств государственного задания № FGFU-2022-0006

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.10.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Metelkin A.A.<sup>1</sup>, Sergeeva E.A.<sup>1</sup>, Popov M.A.<sup>2</sup>, Sokolovskaya A.A.<sup>1</sup>, Zybin D.I.<sup>2</sup>, Shumakov D.V.<sup>2</sup>

## Evaluation of platelet apoptosis markers in patients before and after myocardial revascularization

<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

<sup>2</sup>Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute,  
Shchepkina St. 61/2, Moscow, 129110, Russian Federation

**Background.** Cardiovascular diseases have remained the leading cause of death worldwide for more than 30 years. In the structure of circulatory diseases, the main place belongs to ischemic heart disease (IHD). Coronary artery bypass grafting is one of the main surgical methods for treatment of IHD. Predicting the postoperative outcome is complicated. Indicators of platelet apoptosis may become markers for predicting the risk of adverse outcomes.

**Aim.** The aim of this study was to assess parameters of platelet apoptosis before and after coronary artery bypass surgery.

**Methods.** The study included 14 patients who underwent coronary artery bypass grafting. Blood samples were taken immediately before and 4-5 days after the surgery and examined using Western blot analysis and flow cytometry. Platelets were stained with FITC-labeled Annexin V and also treated with antibodies to pro- and anti-apoptotic proteins (BAX, BCL-2, cytochrome c, caspase 3).

**Results.** Study patients demonstrated a significant postoperative decrease in the markers of platelet apoptosis. Most of the patients (84.98%) showed a reduced Annexin V binding compared to the preoperative baseline, which indicated a decrease in the number of platelets during early apoptosis. Western blotting showed a decrease in major pro-apoptotic proteins (BAX, 87.76%; BAK, 91.18%), which also indicated a decrease in the number of apoptotic platelets.

**Conclusion.** This pilot study showed that the functional parameters of platelets detected in patients with IHD differed from the characteristics of platelets from the same patients after myocardial revascularization. These results suggest that platelet metabolism is involved in the mechanism of IHD that reflects the disease severity. Future studies are needed to determine the potential prognostic role of platelet apoptosis in IHD patients.

**Keywords:** *apoptosis; ischemic heart disease; platelets*

**For citation:** Metelkin A.A., Sergeeva E.A., Popov M.A., Sokolovskaya A.A., Zybin D.I., Shumakov D.V. Evaluation of platelet apoptosis markers in patients before and after myocardial revascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 13-21. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.13-21

**Author's contribution:** concept and design of the study, article editing – Sokolovskaya A.A.; material processing, research, writing, and preparation of illustrative material – Metelkin A.A., Sergeeva E.A., Popov M.A., Zybin D.I., Shumakov D.V.; statistical processing of the results – Metelkin A.A.; material collection and description – Sergeeva E.A., Zybin D.I., Metelkin A.A.; general management of the study – Sokolovskaya A.A., Popov M.A. All authors approved the final version of the manuscript and are responsible for the integrity of all parts of the article.

**For correspondence:** *Metelkin A.A.*, e-mail: armetelkin@gmail.com

### Information about the authors:

Metelkin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8018-4978>

Sergeeva E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4690-6900>

Popov M.A., <https://orcid.org/0000-0002-0316-8410>

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

Zybin D.I., <https://orcid.org/0000-0001-7087-5441>

Shumakov D.V., <https://orcid.org/0000-0003-4204-8865>

**Financing.** The work was supported by the State Assignment № FGFU-2022-0006.

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

Received 06.10.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) более 30 лет остаются одной из главных причин смертности во всем мире. Смертность от ССЗ с 1990 г. выросла на 8 млн и в 2021 г. достигла 20,5 млн че-

ловек, что составляет треть от всех смертей в мире [1]. В структуре болезней системы кровообращения главное место занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). 44% летальных исходов при ССЗ вызва-

ны осложнениями ИБС, такими как инфаркт миокарда [2].

Основными хирургическими методами лечения ИБС являются операции стентирования коронарных артерий и коронарного шунтирования [3]. Оценка отдаленного прогноза после проведенной операции остается сложной задачей. Ведется поиск эффективных маркеров для прогнозирования клинического исхода у пациентов, перенесших операцию реваскуляризации миокарда [4-6]. Одним из таких маркеров может быть функциональное состояние тромбоцитов – малых безъядерных форменных элементов крови. Доказано, что они играют важнейшую роль как в формировании тромба во время сосудистых катастроф, так и в сопутствующем тромбозу воспалению, интерстициальному отеку, эмболизации микроциркуляторного русла и гибели клеток [7-10]. Для оценки функционального состояния тромбоцитов может быть использован феномен апоптоза – программированной клеточной гибели.

Ранее считалось, что апоптоз возможен только в ядерных клетках. Однако было доказано, что в тромбоцитах под воздействием определенных факторов окружающей среды выявляются характерные признаки запрограммированной клеточной гибели и, следовательно, они подвергаются апоптозу так же, как и клетки, содержащие ядра [11-12]. Ряд внутриклеточных событий, таких, как экстернализация фосфатидилсерина на внешний слой мембраны тромбоцитов, снижение митохондриального потенциала, активация каспаз 3, 8, 9, а также активация проапоптотических (BAX, BAK, Cytochrome c) и антиапоптотических (BCL-2, BCL-XL) белков играют важнейшую роль в регуляции апоптоза [13-14].

В последнее время растет интерес к механизмам активации и гибели тромбоцитов при различных заболеваниях [15-17], в том числе, при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [18-19]. Взаимосвязь ИБС и морфофункциональных изменений тромбоцитов требует дальнейшего изучения с целью выявления значимых критериев, позволяющих прогнозировать течение болезни у пациентов с ИБС, перенесших операцию коронарного шунтирования, оценивать послеоперационный риск, а также проводить диспансерное наблюдение и вторичную профилактику сердечно-сосудистых осложнений.

**Цель исследования** – динамическая оценка показателей апоптоза тромбоцитов до операции и в раннем послеоперационном периоде.

#### Методика

**Характеристика пациентов.** В соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Все-

мирной медицинской ассоциации (1964, 2004) образцы крови собирали у пациентов и здоровых добровольцев после письменного информированного согласия на участие в исследовании. Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом ГБУЗ МО МОНИКИ.

В исследование были включены 14 пациентов, страдающих ИБС, которым была назначена операция – хирургическая реваскуляризация миокарда. Критериями включения являлись: наличие гемодинамически значимого стеноза магистральных коронарных артерий, планируемая операция – хирургическая реваскуляризация миокарда, возраст 45-65 лет, критериями исключения – острый инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность III-IV функционального класса, онкологические заболевания, заболевания крови. Исследуемым пациентам гемотрансфузии не проводились. Антиагрегантная терапия отменялась за 3 сут до операции.

Обследование пациентов включало оценку физического состояния, клинические и биохимические анализы, электрокардиографию, эхокардиографию. Диагноз ИБС с множественным поражением коронарных артерий был подтвержден с помощью коронарной ангиографии. Контрольную группу составили 5 добровольцев в возрасте 40-60 лет. Критерии включения: отсутствие сердечно-сосудистой патологии, заболеваний крови, онкологических заболеваний, прием наркотических препаратов, а также препаратов, влияющих на функциональное состояние тромбоцитов.

Образцы крови получали из локтевых вен пациентов (~3 мл) с использованием одноразовых вакуумных систем BD Vacutainer (Becton Dickinson, США), содержащих 2,5% цитрата натрия. Образцы были исследованы в течение 1 ч после забора крови. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

**Анализ жизнеспособности клеток.** Способность тромбоцитов к активации и агрегации оценивали с помощью агрегометра Whole Blood Lumi-Aggregometer (Chrono-log Corporation, США). В качестве индуктора активации была использована АДФ в концентрации 6 мкМ.

**Выделение тромбоцитов.** После центрифугирования цельной крови без торможения при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре (КТ) богатую тромбоцитами плазму (PRP) тщательно отбирали и обрабатывали CD45 MicroBeads и CB235a (Glycophorin A) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия). После прохождения плазмы через колонку MiniMACS в магнитном поле выделенные тромбоциты промывали цитратным

буфером (PBS, 2mM цитрат, 0,5% BSA). Подсчет тромбоцитов проводили в камере Горяева.

**Оценка чистоты выделения тромбоцитов.** Тромбоциты в количестве  $4 \cdot 10^6$  клеток на 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами CD61 (BD, Biosciences, США) в течение 30 мин при 4 °С. После инкубации к клеткам добавляли 400 мкл параформальдегида 1% и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). На цитограмме на основании показателей прямого и бокового рассеивания определили популяцию тромбоцитов, сравнивая ее с микрочастицами известного размера: 2 и 3 мкм (рис. 1, а). Для каждого экспериментального образца анализировали 50 тыс. событий.

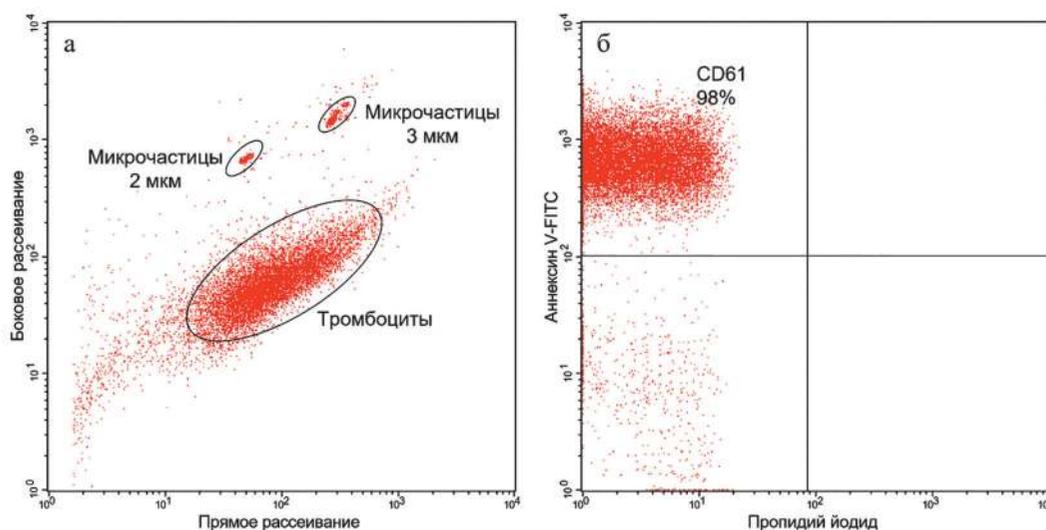
Антиген CD61 ( $\beta 3$  интегрин) присутствует на поверхности как покоящихся, так и активированных тромбоцитов. Экспрессия выделенными частицами этого антигена почти в 100% случаях доказывает чистоту выделения тромбоцитов (рис. 1, б).

**Обработка тромбоцитов ионофором кальция.** В качестве внутреннего положительного контроля был использован ионофор кальция A23187 (HelloBio, Великобритания), который вызывает **немедленный апоптоз** тромбоцитов. Тромбоциты в количестве  $1 \cdot 10^7$  в 100 мкл буфера инкубировали с ионофором кальция при комнатной температуре 15 мин.

**Проточно-цитофлуориметрический анализ количества клеток в состоянии апоптоза.** Выделенные

тромбоциты в количестве  $4 \cdot 10^6$  переносили в пробирку с аннексином V и пропидия йодидом (Invitrogen, США). Образцы инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 мин, после чего, добавив в образец 400 мкл связывающего буфера, проводили анализ на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Для оценки использовался показатель средней интенсивности флуоресценции. Для каждого экспериментального образца анализировали 50 тыс. событий. Сбор данных осуществлялся с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson, США).

**Анализ методом вестерн-блот.** Тромбоциты после выделения лизировали в буфере для радиоиммунопреципитации (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолева кислота натрия, 1% NP-40, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), pH – 7,4). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и 28 мкг общего белка на образец использовали для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия 12%. Образцы из геля были перенесены на мембрану из поливинилидендифторида 0,45 мкм (Immobilon-P Transfer Membrane; Millipore, США) методом полусухого переноса. Мембраны блокировали 5% молоком (Bio-Rad Laboratories, США) в буфере ТБСТ (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 1 ч. Далее мембраны инкубировали с мышинными моноклональными анти-



**Рис. 1.** Оценка чистоты выделения тромбоцитов. а – цитофлуориметрический анализ распределения тромбоцитов и сравнение с микрочастицами заданного размера; б – точечное распределение тромбоцитов.

**Fig. 1.** Evaluation of the purity of platelet isolation. а – cytofluorimetric analysis of platelet distribution and comparison with microparticles of a given size; б – point distribution of platelets.

телами против белков апоптоза BAX, BAK, Caspase-3 (FineTest, Китай), Cytochrome c (AbClonal, США), BCL-2 (BD Biosciences, США) в течение ночи при 4 °С и рабочими разведениями соответствующих первичных антител в присутствии 5% обезжиренного молока с 0,06% NaN<sub>3</sub> в буфере TBST. После инкубации с первичными антителами мембраны промывали буфером TBST по 10 мин, 4 раза, затем инкубировали с вторичными антителами (иммуноглобулин G конъюгированный пероксидазой) в разведении 1:5000 (FineTest, Китай) при температуре 4 °С в течение 1 ч с последующей промывкой в TBST 4 раза по 10 мин.

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

Моноклональные антитела против β-актина (FineTest, Китай) использовали в качестве контроля загрузки.

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Выборка соответствует нормальному распределению, что было оценено с помощью критерия Шапиро–Уилка. Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми. Анализ был выполнен с помощью StatSoft Statistica для Windows.

## Результаты

Первым этапом исследования был отбор пациентов, поступивших в кардиохирургическое отделение для проведения операции реваскуляризации миокарда, и исследование функциональных параметров тромбоцитов. Следующим этапом работы был анализ изменения этих параметров на 4-е – 5-е сут после реваскуляризации миокарда (рис. 2, 3).

По результатам данных проточной цитометрии и вестерн-блота пациенты были разделены на 2 группы. У пациентов 1-й группы ( $n=10$ ) отмечалось устойчивое снижение связывания Аннексина V, показатель средней интенсивности флуоресценции снизился на 33% ( $p < 0,05$ ). У пациентов 2-й группы ( $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), результаты демонстрировали небольшое (на 14%) увеличение среднего показателя флуоресценции, что связано с увеличением количества клеток в стадии раннего апоптоза.

Согласно результатам вестерн-блота, в 1-й группе экспрессия основных белков апоптоза, таких как BAX, BAK, Caspase-3 и Cytochrome снижается после

операции, в то время как экспрессия ингибитора апоптоза BCL-2, напротив, повышается на  $9,91 \pm 5,85\%$ ,  $p < 0,05$ . Во 2-й группе пациентов снижения не наблюдается: экспрессия белков остается на прежнем уровне или даже несколько повышается. На рис. 4 представлены данные вестерн-блота 3 пациентов. Пациенты № 1 и № 2 принадлежат к 1-й группе, они демонстрируют снижение проапоптотических белков и повышение BCL-2. Пациент № 3 принадлежит к 2-й группе и демонстрирует отсутствие снижения экспрессии таких белков, как BAK и BAX, а BCL-2, напротив, снижается, что говорит о сохранившемся на прежнем уровне апоптозе тромбоцитов.

Также следует отметить (рис. 5), что в сравнении с другими белками апоптоза, экспрессия белка BAX значительно снижается в 1-й группе ( $68,99 \pm 10,24\%$  против  $87,69 \pm 12,55\%$  BAK) и сильнее возрастает во 2-й группе ( $138,13 \pm 11,25\%$  против  $107,90 \pm 7,51\%$  BAK,  $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Широко известно, что состояние тромбоцитов оказывает влияние на течение ишемической болезни сердца. Терапия, направленная на подавление активности тромбоцитов, является важнейшим компонентом лечения таких пациентов, независимо от вероятности оперативного лечения [3], при этом более агрессивная терапия показывает лучшие результаты [20]. Ведутся исследования по выявлению обратной связи —

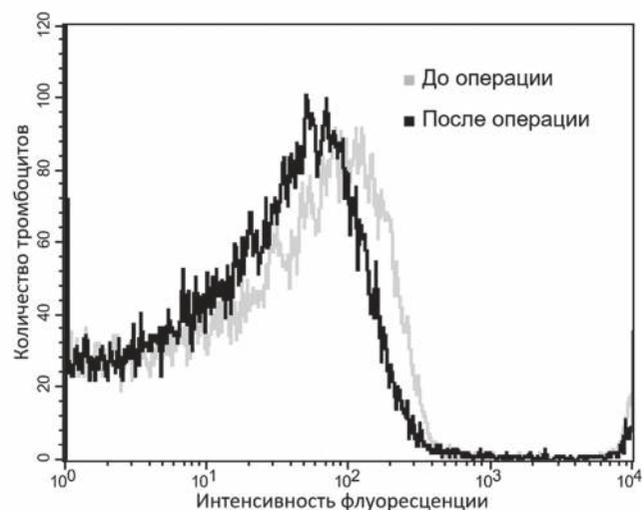


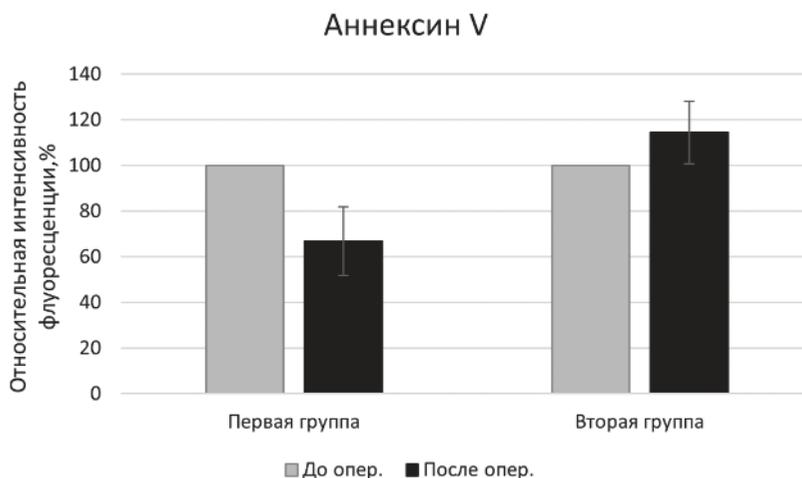
Рис. 2. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов.

Fig. 2. Phosphatidylserine externalization on the platelet surface.

как само заболевание может влиять на состояние тромбоцитов и, следовательно, как можно прогнозировать течение заболевания по состоянию тромбоцитов [18]. Исследуют маркеры на поверхности тромбоцитов, такие, как GPIIb/IIIa [21], p-селектин [22-23]; циркулирующие молекулы, связанные с тромбоцитами – матриксные металлопротеиназы [24-25], SCUBE1 [26]; и даже такие факторы, как размер тромбоцитов, их вариабельность по объему и относительное количество

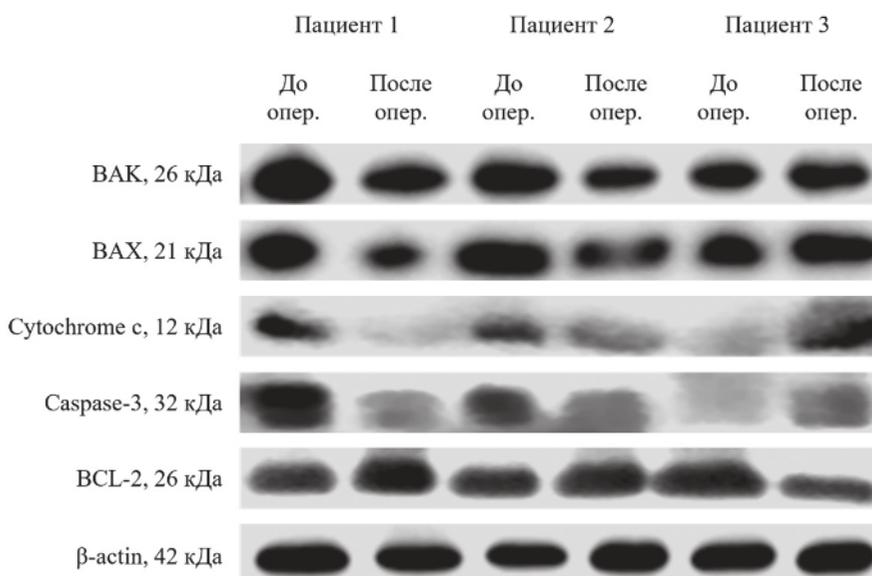
среди всех клеток крови [27]. Ведутся также исследования общего протеома [28] тромбоцитов с целью обнаружения белков, специфичных для ИБС и инфаркта миокарда; был выявлен ряд мРНК, экспрессия которых также повышается при этих заболеваниях [29].

Доказано изменение функционального состояния тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом [30-31], однако данные о связи тромбоцитов с проведенным лечением практически отсут-



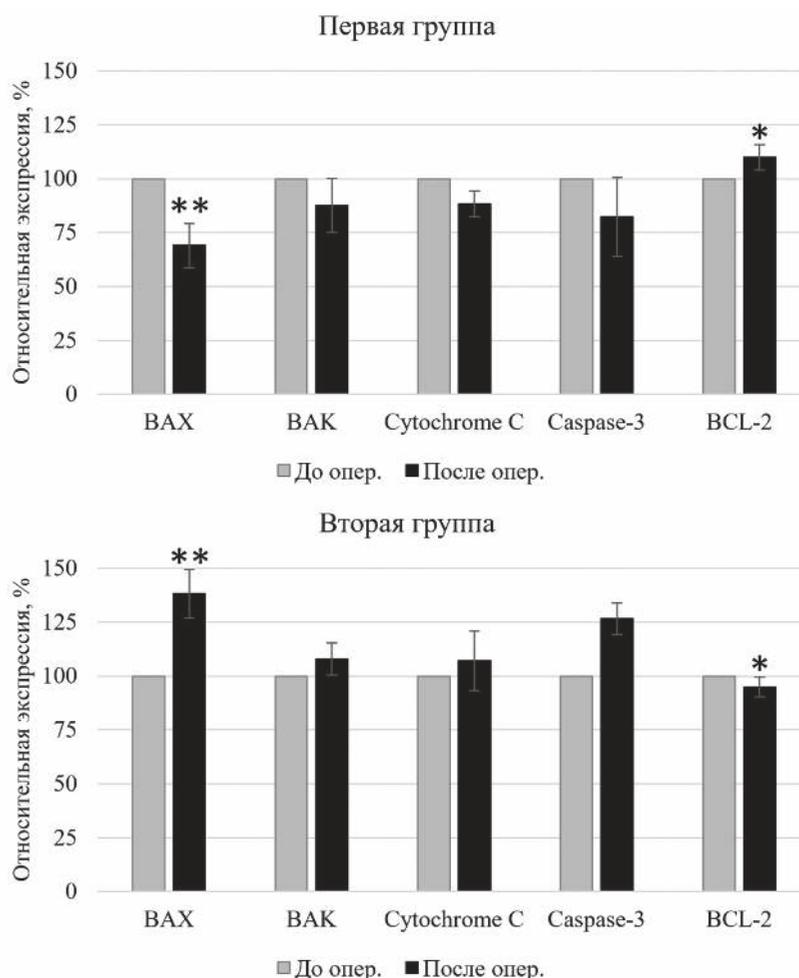
**Рис. 3.** Результаты определения относительной интенсивности флуоресценции аннексина V. Показатели апоптоза у пациентов до операции приведены к 100%.

**Fig. 3.** The results of determining the relative intensity of annexin V fluorescence. The indicators of apoptosis in patients before surgery are shown as 100%.



**Рис. 4.** Результаты определения экспрессии белков апоптоза методом вестерн-блот у пациентов.

**Fig. 4.** The results of determining the expression of apoptosis proteins by the Western blot method in patients.



**Рис. 5.** Результаты количественного определения относительной экспрессии белков апоптоза. Показатели апоптоза у пациентов до операции приведены к 100%. \* – указывает на изменения экспрессии BCL-2, противоположные таковым в экспрессии проапоптотических белков. \*\* – указывает на большее изменение BAX, в сравнении с другими белками апоптоза.

**Fig. 5.** Results of quantitative determination of relative expression of apoptosis proteins. The indicators of apoptosis in patients before surgery are shown as 100%. \* – indicates changes in BCL-2 expression opposite to those in the expression of proapoptotic proteins.

\*\* – indicates a greater change in BAX, compared to other apoptosis proteins.

ствуют – в работе показано, что вместе с улучшением состояния пациентов изменяются и характеристики тромбоцитов.

Результаты нашего исследования продемонстрировали значимое снижение маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов с ИБС после проведенной операции. Большинство из них показали уменьшение связывания с Аннексином V по сравнению с состоянием до операции, что говорит об уменьшении количества клеток в ранней стадии апоптоза. С помощью метода вестерн-блот было показано снижение уровня основных проапоптотических белков, что также указы-

вает на снижение количества тромбоцитов в состоянии апоптоза.

### Заключение

Данные нашего пилотного исследования свидетельствуют о том, что функциональные параметры тромбоцитов, такие как экспрессия фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов и экспрессия белков апоптоза, выявленные у пациентов с ИБС, отличаются от характеристик тромбоцитов у этих же пациентов после реваскуляризации миокарда. Полученные результаты позволяют предположить, что метаболизм тромбо-

цитов вовлечен в механизмы развития ИБС и отражает тяжесть заболевания у пациентов. Необходимы дальнейшие исследования для определения потенциальной прогностической роли маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов с ИБС.

### Литература

(п.п. 1-2; 4-10; 12-31 см. References)

3. Стабильная ишемическая болезнь сердца. Клинические рекомендации 2020. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(11): 4076.
11. Миндукшев И.В., Рукояткина Н.И., Добрылко И.А., Скверчинская Е.А., Никитина Е.Р., Кривошлык В.В. и др. Особенности апоптоза безъядерных клеток: тромбоцитов и эритроцитов человека. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2013; 99(1): 92-110.

### References

1. Lindstrom M., DeCleene N., Dorsey H., Fuster V., Johnson C.O., LeGrand K.E., et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaboration, 1990-2021. *J Am Coll Cardiol*. 2022; 80(25): 2372-425.
2. Khan M.A., Hashim M.J., Mustafa H., Baniyas M.Y., Al Suwaidi S.K.B.M., AlKatheeri R. et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020 Jul 23; 12(7): e9349.
3. Clinical practice guidelines for Stable coronary artery disease. *Russian Journal of Cardiology*. 2020; 25(11): 4076. (In Russian)
4. Karadeniz F.Ö., Karadeniz Y., Altuntaş E. Systemic immune-inflammation index, and neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios can predict clinical outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Cardiovasc J Afr*. 2023 May 5; 34: 1-7.
5. Zhang S., Wu Z., Zhuang Y., Sun X., Wang J., Chen S., et al. The metabolic score for insulin resistance in the prediction of major adverse cardiovascular events in patients after coronary artery bypass surgery: a multicenter retrospective cohort study. *Diabetol Metab Syndr*. 2023 Jul 17; 15(1): 157.
6. Wu Z., Guo D., Chen S., Sun X., Zhang Y., Liu X., et al. Combination of the triglyceride-glucose index and EuroSCORE II improves the prediction of long-term adverse outcomes in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Diabetes Metab Res Rev*. 2023 Nov; 39(8): e3710.
7. Michelson A., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P. *Platelets 4th edition*. 2019.
8. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(3): 498-511.
9. Schanze N., Bode C., Duerschmied D. Platelet Contributions to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Immunol*. 2019; 10: 1260.
10. Khodadi E. Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules. *Cardiovasc Toxicol*. 2020; 20(1): 1-10.
11. Mindukshev I.V., Rukoiatkina N.I., Dobrylko I.A., Skverchinskaja E.A., Nikitina E.R., Krivoslyk V.V., et al. Characterisation of enucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes. *Russ Fiziol Zhurnal Im I.M. Sechenova*. 2013 Jan; 99(1): 92-110. (In Russian)

12. Brown S.B., Clarke M.C., Magowan L., Sanderson H., Savill J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. *J Biol Chem*. 2000; 275(8): 5987-96.
13. Mason K.D., Carpinelli M.R., Fletcher J.I., Collinge J.E., Hilton A.A., Ellis S., et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*. 2007 Mar 23; 128(6): 1173-86.
14. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev*. 2012; 26(2): 51-63.
15. Thushara R.M., Hemshekhar M., Basappa, Kemparaju K., Rangappa K.S., Girish K.S. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015; 93(3): 149-58.
16. Wu F., Liu Y., Luo L., Lu Y., Yew D.T., Xu J., et al. Platelet mitochondrial dysfunction of DM rats and DM patients. *Int J Clin Exp Med*. 2015 May 15; 8(5): 6937-46.
17. Stein T., Hinselmann R., Gowin C., Greber D., Shllaku S., Gözl N., et al. Activation of Platelet Apoptosis and Autophagy in Immune Thrombocytopenia: New Mechanistic Insights. *J Comp Pathol*. 2022; 191: 60.
18. Ferroni P., Riondino S., Vazzana N., Santoro N., Guadagni F., Davi G. Biomarkers of platelet activation in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2012; 108(6): 1109-23.
19. Ziogos E., Chelko S.P., Harb T., Engel M., Vavuranakis M.A., Landim-Vieira M., et al. Platelet activation and endothelial dysfunction biomarkers in acute coronary syndrome: the impact of PCSK9 inhibition. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2023 Nov 2; 9(7): 636-46.
20. Sarathy K., Wells G.A., Singh K., Couture E., Chong A.Y., Rubens F., et al. Platelet Quiescence in Patients With Acute Coronary Syndrome Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *J Am Heart Assoc*. 2021 Feb; 10(5): e016602.
21. Tantry U.S., Bliden K.P., Suarez T.A., Kreutz R.P., Dichiaro J., Gurbel P.A. Hypercoagulability, platelet function, inflammation and coronary artery disease acuity: results of the Thrombotic Risk Progression (TRIP) study. *Platelets*. 2010; 21(5): 360-7.
22. Ferroni P., Pulcinelli F.M., Lenti L., Gazzaniga P.P. Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *Thromb Haemost*. 1999 Mar; 81(3): 472-3.
23. Shen L., Yang T., Xia K., Yan Z., Tan J., Li L., et al. P-selectin (CD62P) and soluble TREM-like transcript-1 (sTLT-1) are associated with coronary artery disease: a case control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2020 Aug 24; 20(1): 387.
24. Blankenberg S., Rupprecht H.J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1; 107(12): 1579-85.
25. Bräuninger H., Krüger S., Bacmeister L., Nyström A., Eyerich K., Westermann D., et al. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2023 May 9; 118(1): 18.
26. Özkara T., Yüksel V., Güçlü O., Hüseyin S., Özgün E., Turan F.N., et al. Pericardial SCUBE1 levels may help predict postoperative results in patients operated on for coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc J Afr*. 2021 Sep-Oct 23; 32(5): 243-7.
27. Budzianowski J., Pieszko K., Burchardt P., Rzeźniczak J., Hiczkiewicz J. The Role of Hematological Indices in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Dis Markers*. 2017: 3041565.

28. Maguire P.B., Parsons M.E., Szklanna P.B., Zdanyte M., Münzer P., Chatterjee M., et al. Comparative Platelet Release Proteomic Profiling of Acute Coronary Syndrome versus Stable Coronary Artery Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020 Jun 24; 7: 101.
29. Szelenberger R., Karbownik M.S., Kacprzak M., Maciak K., Bijak M., Zielińska M., et al. Screening Analysis of Platelet miRNA Profile Revealed miR-142-3p as a Potential Biomarker in Modeling the Risk of Acute Coronary Syndrome. *Cells.* 2021 Dec 14; 10(12): 3526.
30. Bao J., Lin L. Platelet apoptosis in patients with acute coronary syndromes [published correction appears in *J Thromb Thrombolysis.* 2015 May; 39(4): 547]. *J Thromb Thrombolysis.* 2015; 39(4): 539-46.
31. Sokolovskaya A.A., Popov M.A., Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Zybin D.I., Shumakov D.V., et al. Investigation of Platelet Apoptosis in Patients after Surgical Myocardial Revascularization. *Biomedicine.* 2023 Jan 18; 11(2): 251.

**Сведения об авторах:**

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

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

**Попов Михаил Александрович**, канд. мед. наук, врач-кардиохирург, ст. науч. сотр. ГБУЗ Московской области «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского»;

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

**Зыбин Дмитрий Игоревич**, канд. мед. наук, зав. отд-нием кардиохирургии, ГБУЗ Московской области «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского»;

**Шумаков Дмитрий Валерьевич**, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, гл. внештатный специалист кардиохирург МО, зав. отд-нием ГБУЗ Московской области «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского».

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-01/616-07

Громенко И.Д.<sup>1</sup>, Галимова Э.Ф.<sup>1</sup>, Салимгареева М.Х.<sup>2</sup>, Громенко Р.И.<sup>1</sup>, Галимов Ш.Н.<sup>1</sup>, Громенко Д.Д.<sup>1</sup>,  
Галимов К.Ш.<sup>3</sup>, Литвицкий П.Ф.<sup>3</sup>

## Ассоциация фрагментации ДНК с кинетическими параметрами сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр», 450076, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Гафури, д. 74;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2

**Введение.** Несмотря на увеличение частоты использования анализа ДНК-фрагментации сперматозоидов в последние годы, сохраняются ограничения, связанные со стоимостью и трудоемкостью метода. Это не позволяет применять указанный метод как для изучения патогенеза заболевания, так и внедрения метода в практику диагностики мужского бесплодия. Одним из путей решения этой проблемы стал поиск параметров эякулята, тесно связанных с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов. К числу таких параметров относят кинетические показатели сперматозоидов, получаемые с помощью компьютерного анализа эякулята (CASA).

**Цель исследования** – выявление корреляции изменений параметров CASA с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием.

**Методика.** В ретроспективном исследовании приняли участие 96 мужчин в возрасте от 25 до 49 лет с верифицированным диагнозом идиопатического бесплодия. Компьютерный анализ эякулята проведен с использованием программного обеспечения MMS Sperm. Оценка фрагментации ДНК осуществлялась методом TUNEL (The terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling assay). Для подсчета доли клеток с поврежденной ДНК (в %) использована проточная цитометрия на аппарате «Beckman Coulter Navios Flow Cytometer».

**Результаты.** Среди параметров, определяемых CASA, статистически значимую корреляцию с уровнем ДНК фрагментации имели: прямолинейная скорость движения (VSL) ( $r=-0,522726$ ;  $p<0,01$ ) сперматозоидов, скорость их криволинейного движения (VCL) ( $r=-0,499096$ ;  $p<0,01$ ); скорость движения по среднему пути (VAP) ( $r=-0,429533$ ;  $p<0,01$ ); амплитуда бокового смещения головки (ALH) ( $r=-0,294779$ ;  $p<0,01$ ); линейность криволинейного пути (LIN) ( $r=-0,385796$ ;  $p<0,01$ ); степень прямолинейно направленных движений сперматозоидов (STR) ( $r=-0,268248$ ;  $p<0,05$ ), прогрессивная подвижность ( $r=-0,411547$ ;  $p<0,01$ ).

**Заключение.** Полученные в работе фактические данные продемонстрировали обоснованность использования CASA с целью отбора пациентов для проведения оценки фрагментации ДНК сперматозоидов. Необходимы также дополнительные исследования для установления референсных значений кинетических показателей.

**Ключевые слова:** идиопатическое мужское бесплодие; фрагментация ДНК сперматозоидов; компьютерный анализ эякулята

**Для цитирования:** Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Салимгареева М.Х., Громенко Р.И., Галимов Ш.Н., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Литвицкий П.Ф. Ассоциация фрагментации ДНК с кинетическими параметрами сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 22-28.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.22-28

**Участие авторов:** концепция и дизайн работы – Галимова Э.Ф.; сбор данных – Громенко Д.Д., Громенко Р.И.; анализ и интерпретация данных – Салимгареева М.Х., 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 Э.Ф., 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 10.10.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Gromenko I.D.<sup>1</sup>, Galimova E.F.<sup>1</sup>, Salimgareeva M.Kh.<sup>2</sup>, Gromenko R.I.<sup>1</sup>, Galimov Sh.N.<sup>1</sup>, Gromenko D.D.<sup>1</sup>, Galimov K.Sh.<sup>3</sup>, Litvitskiy P.F.<sup>3</sup>

## Association of DNA fragmentation with kinetic parameters of spermatozoa in men with idiopathic infertility

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, Lenina St. 3, Ufa, 450008, Russian Federation;

<sup>2</sup>Bashkortostan Republic Medical Genetics Center, Gafuri St. 74, Ufa, 450076, Republic of Bashkortostan;

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bldg. 2, Moscow, 119991, Russian Federation

**Introduction.** Despite the recent increase in the use of the analysis of sperm DNA fragmentation, the high cost and complexity of the method prevent it from being used for studying the disease pathogenesis and routine diagnostics of male infertility. A solution to this problem was the search for ejaculate parameters associated with the level of sperm DNA fragmentation. These parameters include the kinetic properties of spermatozoa obtained using computer-assisted analysis of the ejaculate (CASA).

**Aim of the study:** To examine correlations between kinetic properties of spermatozoa determined by CASA and the degree of sperm DNA fragmentation in men with idiopathic infertility.

**Methods.** This retrospective study involved 96 men aged 25 to 49 yrs with documented idiopathic infertility. CASA was performed using MMC Sperm software. DNA fragmentation was assessed with the terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labelling assay (TUNEL) using an Invitrogen Apo-Direct™ kit. Flow cytometry (Beckman Coulter Navios Flow Cytometer) was used to calculate the percentage of cells with damaged DNA.

**Results.** The following CASA parameters had significant correlations with the degree of DNA fragmentation: 1) velocity along the straight-line path (VSL) ( $r=-0.522726, p<0.01$ ); 2) velocity along the curvilinear path (VCL) ( $r=-0.499096, p<0.01$ ); 3) velocity along the average path (VAP) ( $r=-0.429533, p<0.01$ ); 4) the amplitude of the lateral displacement of the head (ALH) ( $r=-0.294779, p<0.01$ ); 5) linearity (LIN) ( $r=-0.385796, p<0.01$ ); 6) straightness (STR) ( $r=-0.268248, p<0.05$ ); and 7) progressive motility ( $r=-0.411547, p<0.01$ ).

**Conclusion.** The data support the use of CASA-determined kinetic properties of spermatozoa to select patients for evaluation of DNA fragmentation. However, additional studies are needed to establish reference values for changes in the kinetic properties.

**Keywords:** idiopathic male infertility; sperm DNA fragmentation; computer-assisted sperm analysis

**For citation:** Gromenko I.D., Galimova E.F., Salimgareeva M.Kh., Gromenko R.I., Galimov Sh.N., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Litvitskiy P.F. Association of DNA fragmentation with kinetic parameters of spermatozoa in men with idiopathic infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 22-28. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.22-28

**Author's contribution:** concept and design of the work – Galimova E.F.; data collection – Gromenko D.D., Gromenko R.I.; analysis and interpretation of data – Salimgareeva M.Kh., Galimov K.Sh.; writing of the article – Gromenko I.D., Galimova E.F.; editing of the article – 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:** *Elmira F. Galimova*, Doctor of medical sciences, associate professor; FSBEI HE «Bashkir State Medical University», 3 Lenina str., 450008, Ufa, Russian Federation, e-mail: efgalimova@mail.ru

### Information about the authors:

Gromenko I.D., <https://orcid.org/0000-0001-8582-660X>

Galimova E.F., <https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>

Salimgareeva M.H., <https://orcid.org/0009-0009-0231-9828>

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.** The study was supported by the Russian Science Foundation grant # 23-25-00140.

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

Received 10.10.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Тенденцией последних лет в андрологии стало внедрение анализа фрагментации ДНК сперматозоидов (Sperm DNA Fragmentation – SDF) с целью расшифровки звеньев патогенеза и повышения эффективности диа-

гностики мужского бесплодия [1]. Этот вид исследования позволяет оценить степень повреждения генетического материала сперматозоидов и выявить патогенетическую основу развития идиопатического бесплодия [2, 3].

Фрагментация ДНК представляет собой нарушение ее целостности, которое может появляться в одной или в обеих ее цепях. Разрывы цепей ДНК гамет происходят вследствие нарушения конденсации хроматина, незавершенного апоптоза, активации окислительного стресса и, возможно, иных еще не установленных причин [4]. С увеличением SDF снижается фертильность мужчин, нарушается нормальное развитие эмбриона, растет число случаев невынашивания плода.

В 2021 г. Всемирная Организация Здравоохранения включила метод оценки фрагментации ДНК сперматозоидов в 6-ю редакцию «Руководства по лабораторному исследованию и обработке эякулята человека». В Руководстве дана подробная характеристика метода, видов лабораторного исследования и представлены существующие ограничения. Так, одной из основных проблем при внедрении метода в практику является отсутствие четких критериев целесообразности проведения исследования [5]. Общеизвестными показаниями к оценке SDF остаются необъяснимое бесплодие при нормальных показателях спермограммы, идиопатическое мужское бесплодие при неудачных попытках вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), повторные выкидыши и невынашивания плода [6]. В связи с дороговизной и трудоемкостью исследования выполнение теста в рутинном порядке становится затруднительным и требует поиска альтернативных критериев отбора пациентов [4, 7]. Решение указанной проблемы может быть достигнуто на основе выявления дополнительных параметров эякулята, связанных с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов.

Одним из таких направлений является установление связи между морфокинетическими показателями спермы и степенью SDF [8, 9]. Для оценки состояния структуры и подвижности сперматозоидов используются такие методы, как стандартный анализ эякулята, оцениваемый специалистом в «ручном режиме», а также компьютерный анализ, позволяющий применять современные информационно-технические возможности для отслеживания и характеристики одновременно сотен и тысяч клеток.

В ряде работ с помощью анализа стандартной спермограммы продемонстрирована ассоциация между степенью ДНК-фрагментации и прогрессивной подвижностью сперматозоидов, а также отсутствие значимой корреляции с их концентрацией и морфологическими показателями, за исключением аномалий головки гаметы [10, 11]. Тем не менее, более значимыми и перспективными представляются исследования, характеризующие зависимость отдельных паттернов подвижности сперматозоидов от степени повреждения их

ДНК. В этих целях применяется метод компьютерного анализа эякулята (computer-assisted ejaculate analysis – CASA), который позволяет дать детальную оценку различных параметров прямолинейного и криволинейного движения гамет, включая его амплитуду, скорость, траекторию и другие характеристики. Однако в настоящее время количество работ, посвященных этой теме крайне мало [12–14].

**Цель исследования** – выявление патогенетически значимой корреляции между изменениями параметров CASA и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием.

### Методика

В ретроспективном исследовании приняли участие 96 мужчин в возрасте 25–49 лет, которые наблюдались в медицинском центре «Семья» с диагнозом «Идиопатическое мужское бесплодие». Критериями исключения являлись: наличие установленных причин бесплодия, полное отсутствие подвижных сперматозоидов в анализе (криптозооспермия), азооспермия, невозможность сдать анализ (анэякуляция). Пациентами было подписано информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Обследуемые сдавали эякулят после двухдневного полового воздержания. Далее 1 мл эякулята использовали для проведения компьютерного анализа, оставшийся объем – для определения степени фрагментации ДНК сперматозоидов.

В анализе CASA применялось программное обеспечение MMC Sperm. Оценивались следующие кинетические характеристики сперматозоидов: скорость криволинейного движения (VCL) сперматозоидов; скорость их прямолинейного движения (VSL); скорость движения по среднему пути (VAP); амплитуда бокового смещения головки (ALH); линейность криволинейного пути (LIN); степень отклонения фактической траектории относительно усредненной (WOB); частота, с которой криволинейная траектория пересекает средний путь движения сперматозоида (BCF); степень прямолинейно направленных движений сперматозоидов (STR).

Оценка фрагментации ДНК осуществлялась методом TUNEL (The terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling assay) с применением набора Invitrogen Apo-Direct™ Kit. Для подсчета числа клеток с поврежденной ДНК использована проточная цитометрия на аппарате «Beckman Coulter Navios Flow Cytometer».

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Pandas – Python Data Analysis Library, для визуализации результатов – Plotly

Python Open Source. После проверки на нормальность распределения показателей по Шапиро–Уилка, был использован метод ранговой корреляции Спирмена для выявления взаимосвязанных величин. Сила корреляционных связей оценивалась по шкале Чеддока [15].

### Результаты и обсуждение

Результаты корреляционного анализа взаимосвязи уровня фрагментации ДНК с кинетическими характеристиками сперматозоидов представлены в **таблице**.

Нами выявлена группа параметров, имеющих значимую корреляционную связь с ДНК-фрагментацией. Так, прогрессивная подвижность сперматозоидов оказалась обратно пропорциональной степени повреждения генетического материала ( $r=-0,411547$ ;  $p<0,01$ ) (**рис. 1**), что находит подтверждение в исследованиях других авторов [10–13]. Сила обратной связи по шкале Чеддока оценивается как умеренная.

Из параметров, определяемых при компьютерном анализе эякулята, статистически значимую ассо-

циацию с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов, имели также VCL, VSL, VAP, ALH, LIN и STR. Наиболее сильная корреляционная связь выявлена с показателем прямолинейной скорости движения ( $r=-0,522726$ ;  $p<0,01$ ). Согласно шкале Чеддока, сила ассоциации оценивалась как умеренная. К другим параметрам, с наличием умеренной корреляционной связи, относились: скорость криволинейного пути ( $r=-0,499096$ ;  $p<0,01$ ) и скорость движения по среднему пути ( $r=-0,429533$ ;  $p<0,01$ ), а среди производных параметров – линейность криволинейного пути ( $r=-0,385796$ ;  $p<0,01$ ) (**рис. 2**).

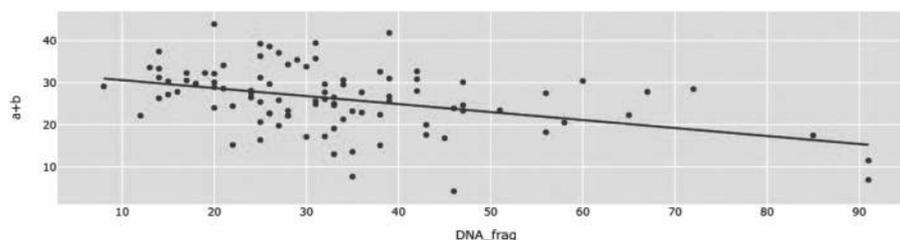
В то же время, такие параметры, как ALH и STR, хотя и обладали значимой корреляционной связью ( $r=-0,294779$ ;  $p<0,01$  и  $r=-0,268248$ ;  $p<0,05$  соответственно), характеризовались взаимосвязью слабой силы (**рис. 3**).

Таким образом, полученные результаты, в целом, не противоречат данным других авторов. Однако они содержат некоторые характерные отличия, связанные с различной специфичностью использованных ме-

**Взаимосвязь уровня фрагментации ДНК с кинетическими характеристиками сперматозоидов, рассчитанных с помощью компьютерного анализа эякулята CASA**

**The relationship between the level of DNA fragmentation and the kinetic characteristics of sperm calculated using computer analysis of ejaculate CASA**

Кинетические характеристики сперматозоидов / sperm kinetic characteristics	Коэффициент корреляции Спирмена, $r$ / Spearman correlation coefficient, $r$	Статистическая значимость, $p$ / $P$ -value
Прогрессивная подвижность сперматозоидов / Progressive sperm motility	-0,411547	<0.01
VCL	-0,499096	<0.01
VSL	-0,522726	<0.01
VAP	-0,429533	<0.01
ALH	-0,294779	<0.01
BCF	-0,025033	>0.05
LIN	-0,385796	<0.01
STR	-0,268248	<0.05
WOB	-0,128926	>0.05



**Рис. 1.** Взаимосвязь фрагментации ДНК и прогрессивной подвижности сперматозоидов.  $a+b$  – совокупная фракция прогрессивно подвижных сперматозоидов.

**Fig. 1.** Relationship between DNA fragmentation and progressive sperm motility.  $a+b$  – total fraction of progressively motile spermatozoa.

тодических подходов, особенностями формирования выборки пациентов и др.

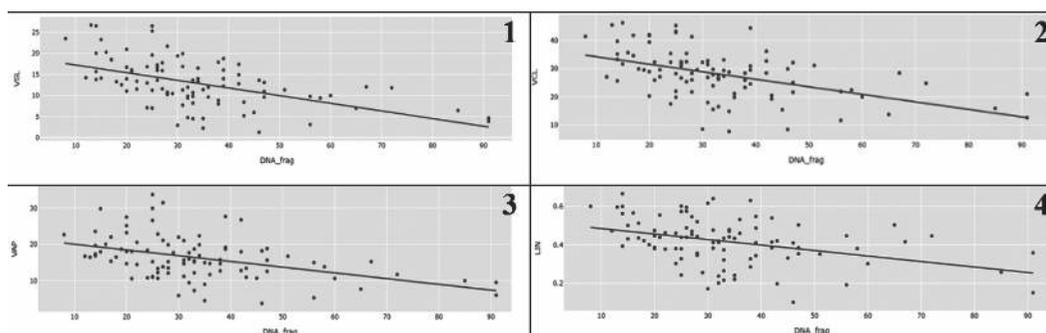
Как упоминалось, многими авторами продемонстрирована обратная связь прогрессивной подвижности сперматозоидов с уровнем SDF, что совпадает с результатами нашей работы. В исследовании S. Chua и соавт. [16], опубликованном в марте 2023 г., при ретроспективной оценке 2567 случаев была установлена значимая отрицательная корреляция для параметра прогрессивной подвижности ( $r=-0,257$ ;  $p<0,0001$ ) по отношению к степени повреждения генетического материала. Однако в этой работе для оценки ДНК-фрагментации применялся не наиболее часто используемый TUNEL-тест, а тест дисперсии хроматина (sperm chromatin dispersion, SCD) и SCSA-анализ (Sperm Chromatin Structure Assay), что ограничивает возможность экстраполяции этих данных на все исследования [17].

Huang W. et al. оценили возможность применения такого показателя как относительное содержание не прогрессивно подвижных и неподвижных сперматозоидов в качестве показателя уровня повреждения их ДНК [18]. Согласно полученным результатам, доля таких сперматозоидов прямо пропорциональна степени ДНК-фрагментации ( $r=0,50$ ,  $p<0,001$ ). Прогностиче-

ская ценность параметра достигала 77-78%. Помимо этого, в ходе исследования установлена отрицательная корреляция между фрагментацией ДНК и такими параметрами как VCL, VSL, VAP, ALH, LIN и STR.

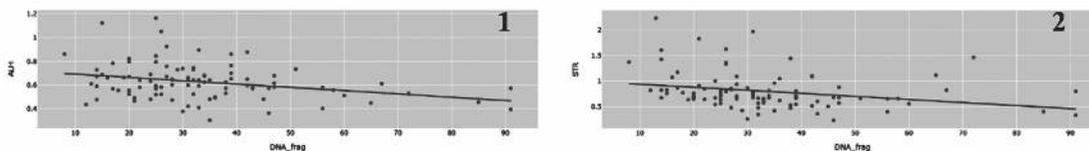
Оригинальные результаты были получены группой Н. Lin и соавт. [12]. В работе установлена значимая обратная связь показателя фрагментации ДНК сперматозоидов с базовыми параметрами CASA – VCL, VSL, VAP и ALH, но не выявлено корреляции с производными величинами – LIN и STR. Авторами также было показано, что совместное использование морфокинетических параметров CASA, рутинного анализа морфологии клеток и оценки уровня фрагментации ДНК значительно повышает прогностическую способность исследования и в большинстве случаев является оптимальным индикатором мужской фертильности.

Низкий (физиологический) уровень ДНК-фрагментации по данным большинства исследований сочетается, как правило, с высокими значениями кинетических показателей компьютерного мониторинга – VAP, VCL, VSL и STR, что согласуется с нашими результатами. Вместе с тем, в работе А. Aghazarian и соавт. [13] была продемонстрирована связь между степенью повреждения генетического материала гамет и частотой пересечения криволинейной траекторией



**Рис. 2.** Зависимость кинетических параметров CASA от фрагментации ДНК сперматозоидов с умеренной силой корреляционных связей по шкале Чеддока. 1 – VSL от ДНК фрагментации; 2 – VCL от ДНК фрагментации; 3 – VAP от ДНК фрагментации; 4 – LIN от ДНК фрагментации.

**Fig. 2.** The dependences of the kinetic parameters of CASA on the DNA of sperm fragmentation with moderate strength of correlations according to the Chaddock scale. 1 – VSL on DNA fragmentation; 2 – VCL on DNA fragmentation; 3 – VAP on DNA fragmentation; 4 – LIN on DNA fragmentation.



**Рис. 3.** Зависимость кинетических параметров CASA от ДНК фрагментации сперматозоидов со слабой силой корреляционных связей по шкале Чеддока. 1 – ALH от ДНК фрагментации; 2 – STR от ДНК фрагментации.

**Fig. 3.** The dependences of the kinetic parameters of CASA on the DNA fragmentation of spermatozoa with a weak strength of correlations according to the Chaddock scale. 1 – ALH on DNA fragmentation; 2 – STR on DNA fragmentation.

среднего пути движения сперматозоида (BCF), а также отсутствие статистически значимой корреляции с параметрами криволинейного пути (LIN) и амплитудой смещения головки гамет (ALH), что существенно отличается от результатов, полученных в ходе нашего исследования.

Еще одной находкой последнего времени, подтверждающей связь кинетических параметров и повреждения генетического материала сперматозоидов, стал феномен снижения уровня SDF при их прохождении через микрофлюидные чипы. В основе метода лежит способность прогрессивно подвижных сперматозоидов преодолевать прямолинейный микрофлюидный канал и появляться в камере выхода, в то время как клетки с аномальными паттернами движения остаются в камере входа. С помощью микрофлюидной сортировки обнаружено практически полное отсутствие ДНК-фрагментации у сперматозоидов (межквартильный размах составил 0–2.4%) [19]. Указанная методика позволяет также изолировать высококачественные гаметы для их интрацитоплазматической инъекции. Благодаря этому были достигнуты более высокие показатели формирования качественного эмбриона ( $p < 0,001$ ), процесса имплантации ( $p = 0,04$ ) и наступления беременности ( $p = 0,05$ ) по сравнению с классическими способами селекции мужских половых клеток [20, 21].

Таким образом, существует большое количество прямых или косвенных доказательств связи изменений кинетических характеристик эякулята и выраженностью повреждения генетического материала при идиопатическом мужском бесплодии.

### Заключение

Имеется статистически значимая корреляция между степенью фрагментацией ДНК сперматозоидов и кинетическими параметрами, такими как прогрессивная подвижность, прямолинейная скорость движения, скорость движения по среднему пути и скорость криволинейного движения. Это подтверждается результатами исследования указанных показателей у мужчин с идиопатическим бесплодием как в нашей работе, так и других авторов [9–14]. Наряду с этим, корреляционные зависимости для некоторых иных параметров отсутствовали или существенно различались, что требует проведения дополнительных исследований.

С учетом полученных нами данных можно рекомендовать использование морфокинетических параметров CASA в качестве прогностических критериев фрагментации ДНК сперматозоидов и их оплодотворяющей способности. Уточнение паттернов движения гамет, а также их связи с повреждением генетического

материала будет способствовать оптимизации методов селекции сперматозоидов в программах ВРТ, основанных на применении искусственного интеллекта, что является предметом наших дальнейших исследований.

Вместе с тем, остаются практически неизвестными различные аспекты регуляции SDF, ассоциированные, прежде всего, с молекулярными механизмами репарации ДНК и контроля её экспрессии. Они, в свою очередь, зависят от профиля микроРНК различных отделов репродуктивной системы, окислительно-восстановительного статуса гамет, их микроокружения и других, ещё неизвестных факторов [22, 23]. В настоящее время список известных модуляторов фрагментации ДНК сперматозоидов ограничен miR-34c-5p, miR-449b-5p, редокс-отношением  $NAD^+/NADH$  и рядом других соединений. С этих позиций, представляется перспективным дополнение и расширение круга эффекторов с помощью анализа микроРНК различных семейств, продемонстрировавших значимое изменение уровня экспрессии при скрининге пациентов с идиопатическим бесплодием [24], а также оценка дифференциальной экспрессии циркулярных РНК (circRNA), которые могут служить новыми биомаркерами мужского бесплодия [25].

### Литература

#### (п.п. 1; 4–14; 16–25 см. References)

2. 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.
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.
15. Баврина А.П., Борисов И.Б. Современные правила применения корреляционного анализа. *Медицинский альманах*. 2021; 3(68).

### References

1. 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.
2. 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)
3. Galimov Sh.N., Bozhedomov V.A., Galimova E.F., Pavlov V.N., Suhikh G.T. *Male Infertility: Molecular and Immunological Aspects [Muzhskoe besplodie: molekulyarnye i immunologicheskie aspekty]*. Moscow: GEOTAR-Media, 2020. (in Russian)
4. 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.
5. World Health Organization WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6<sup>th</sup> ed. World Health Organization, Geneva 2021.

6. 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.
7. Sharma R., Iovine C., Agarwal A., Henkel R. TUNEL assay-Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*. 2021; 53(2): e13738.
8. 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.
9. Zhang F., Li J., Liang Z., Wu J., Li L., Chen C., et al. Sperm DNA fragmentation and male fertility: a retrospective study of 5114 men attending a reproductive center. *J Assist Reprod Genet*. 2021 May; 38(5): 1133-41.
10. Le M., Nguyen T., Nguyen H., Nguyen T., Nguyen V., Le D. et al. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod Med Biol*. 2019; 18(4): 390-6.
11. Vinnakota C., Cree L., Peek J., Morbeck D. Incidence of high sperm DNA fragmentation in a targeted population of subfertile men. *Syst Biol Reprod Med*. 2019; 65(6): 451-7.
12. Lin H., Wu M., Wu W., Tsai L., Chen Y., Hung K., et al. Incorporating sperm DNA fragmentation index with computer-assisted semen morphokinematic parameters as a better window to male fertility. *Chin J Physiol*. 2022; 65(3): 143-50.
13. Aghazarian A., Huf W., Pflüger H., Klatte T. Standard Semen Parameters vs. Sperm Kinematics to Predict Sperm DNA Damage. *World J Mens Health*. 2021; 39(1): 116-22.
14. Naknam W., Salang L., Sothornwit J., Amnatbuddee S., Seejorn K., Pongsritasana T., et al. Effect of sperm selection method by cumulus oophorus complexes and conventional sperm preparation method on sperm quality and DNA fragmentation for assisted reproduction technology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019; 243: 46-50.
15. Bavrina A.P., Borisov I.B. Modern rules for using correlation analysis. *Meditsinskiy almanakh*. 2021; 3: 68.
16. Chua S., Yovich S., Hinchliffe P., Yovich J. How Well Do Semen Analysis Parameters Correlate with Sperm DNA Fragmentation? A Retrospective Study from 2567 Semen Samples Analyzed by the Halosperm Test. *J Pers Med*. 2023; 13(3): 518.
17. Agarwal A., Farkouh A., Saleh R., Hamoda T., Salvio G., Boitrelle F., et al. Technical Aspects and Clinical Limitations of Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility: A Global Survey, Current Guidelines, and Expert Recommendations. *World J Mens Health*. 2023; 41: e67. <https://doi.org/10.5534/wjmh.230076>
18. Huang W., Chang Y.K., Tung S.Y., Peng B.H., Chang H.C. Sperm motility is the best semen parameter to predict sperm DNA fragmentation. *Urol Sci*. 2021; 32: 157-63.
19. Anbari F., Khalili M.A., Sultan Ahamed A.M., 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.
20. 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.
21. Quinn M.M., Jalalian L., Ribeiro S., Ona K., Demirci U., Cedars M.I., et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum. Reprod*. 2018; 33: 1388-93.
22. Galimov Sh.N., Gromenko J.Y., Bulygin K.V., Galimov K.Sh., Galimova E.F., Sinelnikov M.Y. The level of secondary messengers and the redox state of NAD<sup>+</sup>/NADH are associated with sperm quality in infertility. *J. Reprod. Immunol*. 2021; 148: 103383. DOI: 10.1016/j.jri.2021.103383
23. 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
24. Li H., Wan X., Zhao J., Liang X., Dai Y., Li H. Promising novel biomarkers and therapy targets: The application of cell-free seminal nucleotides in male reproduction research. *Transl Res*. 2023; 256: 73-86. doi: 10.1016/j.trsl.2022.12.006
25. Kyrgiagini M., Mamuris Z. Circular RNAs and Their Role in Male Infertility: A Systematic Review. *Biomolecules*. 2023; 13(7): 1046. doi: 10.3390/biom13071046

**Сведения об авторах:**

**Громенко И.Д.**, ассистент каф. биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**Галимова Э.Ф.**, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, проф. каф. патологической физиологии, доцент

**Салимгареева М.Х.**, зав. отд-нием, ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, Уфа;

**Громенко Р.И.**, ассистент каф. акушерства и гинекологии № 1, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**Галимов Ш.Н.**, зав. каф. биологической химии, проф., ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**Громенко Д.Д.**, ординатор каф. акушерства и гинекологии № 2, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**Галимов К.Ш.**, ассистент каф. патофизиологии, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

**Литвицкий П.Ф.**, проф., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, зав. каф. патофизиологии, член-корр. РАН.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

**Колюбаева С.Н., Мякошина Л.А., Нестерова В.А., Богданов Д.С., Чирский В.С., Глушаков Р.И.**

## **Роль полиморфизма некоторых генов в развитии заболевания COVID-19**

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ,  
194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6

**Введение.** Непосредственный интерес при изучении механизмов развития COVID-19 вызывают генетические маркеры и их полиморфные варианты, а также их ассоциации с клиническим течением и исходом заболевания.

**Цель исследования** – изучение полиморфных вариантов генов *IL-6*, *ACE* и *UGT1A1* и их ассоциации с тяжестью течения и клиническим исходом заболевания COVID-19.

**Методика.** В работе исследовали полиморфизмы генов *IL-6*, *ACE* и *UGT1A1* в 3 группах больных COVID-19: легким и средне-тяжелым течением заболевания ( $n=200$ ), а также умерших в период заболевания или сразу после ( $n=115$ ). Полиморфизм генов определяли методом ПЦР в реальном времени и электрофорезом по конечной точке. При статистической обработке полученных результатов у пациентов в возрасте до 50 лет статистическая значимость данных значительно повышалась, что скорее всего связано с отсутствием коморбидности.

**Результаты.** Генотип GG (ген *IL-6*) встречался в группе больных со среднетяжелым течением заболевания почти в 5 раз реже, чем в группе с легким течением заболевания. Частота встречаемости генотипа DD гена *ACE* была значимо выше (55,6% vs 12,8%) у погибших от COVID-19 в сравнении с переболевшими в легкой форме (ОШ=8,5, 95% ДИ 3,08 -6,91;  $p=0,0001$ ). Наличие полиморфизма гена *UGT1A1* rs8175347 выявило увеличение частоты генотипа \*1/\*28 в группе умерших почти в 2 раза по сравнению с легким течением заболевания, вопреки ожиданиям, так как более высокий исходный уровень билирубина предсказывал повышенную смертность при генотипе \*28/\*28.

**Ключевые слова:** полиморфизм генов; гены *IL-6*; *ACE*; *UGT1A1*; COVID-19; пациенты; умершие

**Для цитирования:** Колюбаева С.Н., Мякошина Л.А., Нестерова В.А., Богданов Д.С., Чирский В.С., Глушаков Р.И. Роль полиморфизма некоторых генов в развитии заболевания COVID-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 29-35.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.29-35

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Колюбаева С.Н.; Глушаков Р.И.; сбор и обработка материала – Богданов Д.С., Нестерова В.А.; подготовка иллюстративного материала – Богданов Д.С.; статистическая обработка материала – Мякошина Л.А.; написание текста – Колюбаева С.Н., Богданов Д.С.; редактирование – Чирский В.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

**Для корреспонденции:** Колюбаева Светлана Николаевна, e-mail: ksnwma@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.07.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

**Kolyubaeva S.N., Myakoshina L.A., Nesterova V.A., Bogdanov D.S., Chirsky V.S., Glushakov R.I.**

## **The role of some genetic polymorphisms in development of COVID-19**

Kirov Military Medical Academy,  
Akademika Lebedeva St. 6, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

**Introduction.** Special interest in studying the mechanisms of COVID-19 is induced by genetic markers and their polymorphic variants as well as their relationship with the clinical course and outcome of the disease.

**Aim.** To study polymorphic variants of the *IL-6*, *ACE* and *UGT1A1* genes and their association with the severity and outcome of COVID-19.

**Methods.** Polymorphisms of the *IL-6*, *ACE*, and *UGT1A1* genes were studied in three groups of patients with mild and moderate ( $n=200$ ) COVID-19 and also those who died during or immediately after the disease ( $n=115$ ). Genetic polymorphism was determined by real-time PCR and endpoint electrophoresis. Statistical significance of results was considerably higher for patients younger than 50 years most likely due to the absence of comorbidity.

**Results.** The GG genotype (*IL-6* gene) was almost 5 times more frequent in the group with mild disease than in the group with moderate disease. The incidence of the *ACE* gene DD genotype was significantly higher (55.6% vs 12.8%) in patients who died from COVID-19 than in patients who had mild disease (OR = 8.5, 95% CI, 3.08-6.91;  $p=0.0001$ ). The presence of a polymorphism in

the *UGT1A1 rs8175347* gene revealed an almost 2-fold increase in the frequency of the \*1/\*28 genotype in the group of deceased compared to mild disease, contrary to expectations, since a higher baseline bilirubin in the \*28/\*28 genotype predicted increased mortality.

**Keywords:** genetic polymorphism; *IL-6*; *ACE*; *UGT1A1*; COVID-19; patients; deceased

**For citation:** Kolyubaeva S.N., Myakoshina L.A., Nesterova V.A., Bogdanov D.S., Chirsky V.S., Glushakov R.I. The role of some genetic polymorphisms in development of COVID-19. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 29-35. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.29-35

**Author's contribution:** concept and design of the study – Kolyubaeva S.N.; Glushakov R.N.; collection and processing of material – Bogdanov D.S., Nesterova V.A.; preparation of illustrative material – Bogdanov D.S.; statistical processing of the material – Myakoshina L.A.; writing the text – Kolyubaeva S.N., Bogdanov D.S.; editing – Chirsky V.S. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

**For correspondence:** Svetlana N. Kolyubaeva, Doctor of Biological Sciences, senior researcher at the research center "Kirov Military Medical Academy" Ministry of Defense of the Russian Federation, e-mail: ksnwma@mail.ru

**Information about the authors:**

Bogdanov D.S., <https://orcid.org/0000-0002-0939-7054>

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

**Financing.** The study had no sponsorship.

Received 27.07.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Информация о генетических детерминантах предрасположенности или устойчивости к различным инфекционным заболеваниям находится на этапе накопления научных знаний, при этом научный поиск осложняется генетической комбинаторикой и феноменом генетической пенетрантности.

В настоящее время по данным популяционных сравнительных исследований определены некоторые генетические полиморфизмы, носительство которых играет решающую роль в развитии гиперответа иммунной системы на инвазию патогена и обеспечивает ускоренное распространение вируса в организме, что клинически проявляется в отягощенном течении заболевания.

Установлено, что на поверхности каждого вириона SARS-CoV-2 расположены шиповидные белки, которые являются главным приспособлением к слиянию с клетками человека. Благодаря своей чрезвычайной гибкости сразу несколько шипов может связываться с одной клеткой. Местом этого связывания является белковый мембранный рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (*ACE2*), имеющий сродство с S-гликопротеинами. Сразу после того, как шипы вируса соединяются с рецептором *ACE2*, другие мембранные белки клетки человека инициируют слияние вирусной и клеточной мембран. Белок мембрано-связанная сериновая протеаза (*TMPRSS2*) помогает более быстрому проникновению вируса в клетку за счет вырезания сайта на S2-субъединице шипа, обнажая ги-

дрофобные молекулы аминокислот. В результате приобретенной таким образом способности растворяться в липидах, вирусы стремительно проникают внутрь клетки [1].

В норме мембранный белок *ACE2* (карбоксипептидаза) переводит ангиотензин 2 в ангиотензин 1-7, который осуществляет вазодилаторную функцию. В результате связывания вирусных частиц с клеткой человека при инфекции SARS-CoV-2 количество рецепторов *ACE2* снижается, что приводит к усилению синтеза этого белка в клетке [2].

Ангиотензин-превращающий фермент (*ACE*), циркулирующий во внеклеточном пространстве, осуществляет превращение неактивного ангиотензина I в активный ангиотензин II. Вторая важная функция *ACE* – деактивация брадикинина – полипептида состоящего из 9 аминокислот, который обладает выраженным сосудорасширяющим действием. Брадикинин увеличивает проницаемость капилляров и вызывает сокращение гладкой мускулатуры.

Таким образом, *ACE* и *ACE2* являются важными компонентами ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, от которых зависит поддержание гомеостаза сердечно-сосудистой системы. При этом *ACE2* играет роль контррегулятора активности комплекса *ACE*-Ангиотензин II (*AGTII*) – Ангиотензин 1 (*AGTI*) [3]

Полиморфизмы генов *ACE2* и *TMPRSS2* играют жизненно важную роль в возникновении, развитии

и прогнозе инфекции SARS-CoV-2, и оба они тесно связаны с уязвимостью, интенсивностью и клиническим исходом коронавирусной инфекции (COVID-19). В целом, эти генетические факторы имеют потенциал для будущей разработки персонализированных лекарств и вакцин против COVID-19 [1].

Так как наиболее частыми осложнениями при вирусной инфекции были тромбообразование и другие сердечно-сосудистые заболевания, важную роль в этом могли играть белки тромбофилии, а также интерлейкины, в частности IL6. Участие последнего в качестве прогностического фактора течения SARS-CoV-2 было показано во многих работах. Повышение уровня маркера воспаления интерлейкина-6 в плазме крови пациентов с хронической болезнью почек и ишемической болезнью сердца связано с увеличением риска инфаркта миокарда, инсульта и внезапной сердечной смерти [4–6].

Кроме того, известно участие этих белков в развитии ряда других заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, выявлена их роль при старении [7].

В последние годы довольно активно исследуется метаболизм лекарственных препаратов, в том числе моноклональных препаратов, при которых происходит глюкуронирование активного метаболита в неактивные соединения для выведения. Эта реакция катализируется ферментом уридиндифосфат-глюкурозилтрансферазы 1A1 (UGT1A1), который превращает небольшие липофильные молекулы в водорастворимые метаболиты для экскреции. Кроме того, UGT1A1 глюкуронизирует билирубин у людей и при полиморфизме \*28 в элементе ТАТАА промотора гена *UGT1A1*, подавляется его экспрессия, что тесно связано с гипербилирубинемией. Фармакогенетический анализ полиморфизма ТА-повтора продемонстрировал связь между генотипом (ТА)<sub>7</sub>/(ТА)<sub>7</sub> (\*28/\*28) и риском гипербилирубинемии у пациентов с резистентностью к моноклональным антителам [8], применение которых в некоторых случаях не обеспечивало положительных результатов.

Цель работы – изучение полиморфизмов генов, участвующих в цитокиновом шторме, а также полиморфизм гена *UGT1A1*, который, как показано, играет существенную роль в метаболизме лекарственных препаратов [9].

### Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех па-

циентов. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей. Работа одобрена этической комиссией.

В работе исследован материал от пациентов перенесших заболевание COVID-19 ( $n=200$ ). Забор крови производили венопункцией в вакутейнеры с ЭДТА и помещали в режим длительного хранения до выполнения молекулярно-генетического исследования. У умерших в период заболевания или сразу после ( $n=115$ ) во время аутопсии проводился забор ткани селезенки размером  $0,5 \times 0,5$  см с целью выделения ДНК, при необходимости материал замораживали и хранили при  $-80$  °С. Сопоставлены материалы пациентов 3 условных групп с разной тяжестью перенесенного заболевания: 1-я группа ( $n=100$ ) – пациенты с легким течением заболевания, или бессимптомные при положительном анализе методом ПЦР (средний возраст –  $26,1 \pm 1,0$  лет), мужчины; 2-я группа ( $n=100$ ) – со среднетяжелым течением заболевания (выявлены поражения легких, средний возраст  $45,0 \pm 1,0$  лет, из них 86% мужчин); 3-я группа ( $n=115$ ) – умершие (средний возраст 58 лет, из них 64% мужчин и 36% – женщин). В каждой группе дополнительно статистически обрабатывали выборку данных пациентов до 50 лет.

ДНК выделяли в соответствии с протоколом, прилагающимся к набору фирмой-производителем (фирма Литех, Россия). Амплификацию проводили на приборе ДТ-Прайм, ООО ДНК-технология (Россия) с применением наборов фирмы Литех (Россия). Детекцию результатов проводили в режиме реального времени (для ACE Alu ins/del rs4646994) или по конечной точке электрофорезом в агарозном геле (для -174G>C гена *IL6 rs1800795* и *UGT1A1 rs8175347*). Кроме того, были исследованы также гены, ассоциированные с развитием тромбофилии (rs6025, rs1799963, 1801394, 1805087, rs1126643) и гены воспаления (rs114327, rs20697762, rs2243250, rs1800872), к которым относятся некоторые интерлейкины и ген некроза опухоли. Для этих целей также использовали наборы фирмы Литех (Россия).

Статистическую обработку результатов генетического сравнения выполняли с помощью статистического пакета SPSS 17.0 и Statistica 6.0, сравнение количественных переменных осуществляли с применением непараметрических критериев Краскела-Уоллиса, попарное сравнение групп – с помощью критерия Манна-Уитни. В случае категориальных переменных оценивали значение критерия Пирсона, учитывая степени свободы. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга, для сравнения частот геноти-

пов в группах исследования использовали программу SNPstat. В случае выявления различий по частотам генотипов изучаемых генов, для оценки ассоциаций, вычисляли отношения шансов (ОШ) и их 95% доверительный интервал (ДИ). Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ , при условии, что значения 95% ДИ не пересекали 1. Значение ОШ в интервале 0–1 соответствует снижению риска, ОШ более 1 – увеличению риска, ОШ равное 1 – отсутствию эффекта.

### Результаты и обсуждение

При исследовании полиморфизма генов, ассоциированных с развитием тромбофилии и генов, ассоциированных с развитием воспаления (IL1, IL10, TNF $\alpha$ ) не было выявлено статистически значимых различий между группами, поэтому мы не приводим этих результатов.

Значимые результаты в этой группе генов были показаны только для интерлейкина 6 (-174G>C).

На **рис. 1, А** представлены результаты анализа генотипов интерлейкина 6 (IL-6) пациентов, перенесших заболевание в легкой форме (средний возраст 26,1 $\pm$ 1,0) и умерших (средний возраст 45,1 $\pm$ 1,1) сразу или в течение месяца после перенесенного заболевания. Сравнение результатов, представленных на **рис. 1, А** показало, что пациенты с генотипом G/G умирали значительно реже ( $p=0,02$ , ОШ = 4,95), чем с генотипом C/G-C/C, что согласуется с данными литературы по ИФА [6]. Из этого следует, что наличие генотипа GG, для которого характерен низкий уровень интерлейкина-6

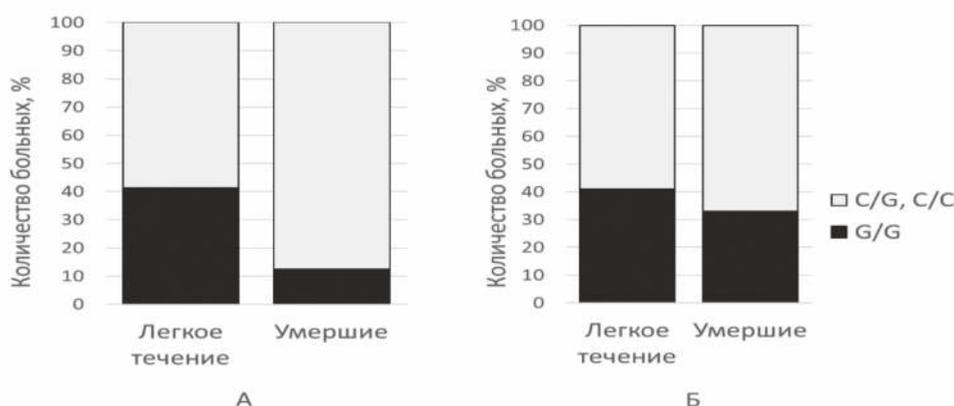
в крови, защищает организм больного от цитокинового шторма и соответственно от тяжелых последствий при COVID-19.

Увеличенное количество IL-6 в плазме крови, которое имеет место при генотипе CC, коррелирует с плохим прогнозом инфицированных COVID-19 [6], что позволило увеличить выживаемость пациентов при использовании блокаторов к рецепторам IL-6. Тоцилизумаб и сарилумаб (гуманизированные моноклональные антитела) являются примерами блокаторов к рецепторам IL-6. Связываясь с IL6R, они не дают возможности связываться IL-6 с IL-6R.

Среди лиц с артериальной гипертензией более часто встречаются генотипы IL-6 GC и GG, независимо от национальной принадлежности за некоторым исключением [10], что может ухудшать прогноз течения заболевания в более поздние сроки и скорее всего является одной из причин гибели более возрастных пациентов.

На **рис. 1, В** представлены результаты исследования полиморфизма гена *IL6* у лиц с легким течением заболевания и у умерших всех возрастных групп (в отличие от **рис. 1, А**, где избирательно представлены только лица до 50 лет). В том случае, если для статистической обработки использовали данные всех пациентов (**рис. 1, В**), различия статистической значимости не были существенными ( $p=0,2$ , ОШ=1,42).

Возможно, объяснение кроется в причинах смерти отличных от основной – тромбоэмболии легочной артерии.



**Рис. 1.** А Исследование полиморфизма гена IL-6 в подгруппе пациентов в возрасте до 50 лет; Б – Исследование полиморфизма гена IL-6 всех возрастных групп пациентов. \*На рисунке 1 представлено сравнение только с данными умерших, так как между группами умерших и среднетяжелых пациентов не выявлено статистических различий.

**Fig. 1.** A Study of IL-6 gene polymorphism in a subgroup of patients under the age of 50 years; B – Study of IL-6 gene polymorphism in all age groups of patients. \*Fig. 1 shows a comparison only with deceased patients, since no statistical differences were found between the groups of deceased and moderate patients.

На **рис. 2, А** представлены результаты исследования полиморфизма гена ACE, который играет важную роль в регуляции кровяного давления.

Из **рис. 2** следует, что генотип Del/Del чаще встречается у больных с тяжелым течением заболевания (средний возраст  $45,0 \pm 1,0$  лет), чем с легким ( $26,1 \pm 1,0$  лет) ( $p=0,005$ , ОШ=3,77 при доверительном интервале 1,47-9,68). Это согласуется с данными литературы: наличие аллеля D чаще встречается у лиц с утолщением стенки миокарда и предрасположенностью к инфаркту миокарда [11].

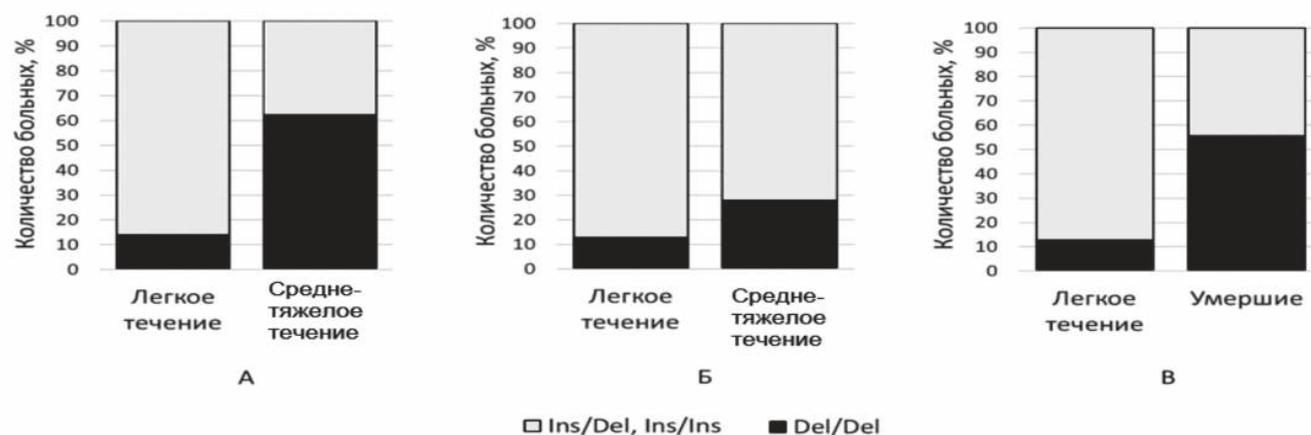
На **рис. 2, Б** представлены те же данные, но полученные при обработке результатов всех больных, перенесших заболевание в легкой, средней и тяжелой форме. Сравнение результатов показывает, что среди пациентов со среднетяжелым течением заболевания генотип Del/Del встречается в несколько раз чаще ( $p=0,014$ ), чем при легком течении, при этом ОШ составляет 2,64, что несколько ниже, чем в группе пациентов до 50 лет.

На **рис. 2, В** представлены результаты сравнения частоты генотипов Ins/Del, Ins/Ins и Del/Del пациентов во всех возрастных категориях, перенесших заболевание в легкой степени тяжести и у умерших. ОШ в этих группах составило 8,5, что свидетельствует о том, что пациенты с генотипом Del/Del в 8,5 раза погибают чаще, чем пациенты с генотипом Ins/Del-Ins/Ins (доста-

точно высокая статистическая значимость,  $p=0,0001$ ). При этом гибель пациентов может быть связана и как с реакцией на проникновение вируса через связывание с рецептором ACE2 и последующим воздействием на ACE, так и с непосредственным влиянием на развитие сердечно-сосудистых заболеваний аллеля Del в генотипе больного. Обращает на себя внимание схожесть графиков А и В на **рис. 2**. Возможно, генотип Del/Del связан как с более тяжелым течением заболевания, так и с формированием причин смерти пациентов с заболеванием COVID-19.

В **таблице** представлены результаты анализа гена *UGT1A1*, из которого следует, что наличие генотипа \*1/\*28 почти в 2 раза чаще с достаточно высокой достоверностью встречается у умерших пациентов, чем у пациентов с легким течением заболевания.

Трудно объяснить, почему в нашем исследовании именно гетерозиготный вариант *UGT1A1* rs8175347 \*1/\*28 (6/7) встречается чаще у умерших, чем гомозиготный \*28/\*28 (7/7), который считается верификацией синдрома Жильбера. Возможно, в случае инфекции COVID-19 гетерозиготный вариант 6/7 проявляет кодоминантные свойства и продуцирует еще более низкий уровень фермента, чем гомозиготный 7/7. Подобные результаты были получены в работе, в которой за период наблюдения в 10,4 года умерло 995 человек (30,0%). В многофакторном регрессионном анализе



**Рис. 2.** Исследование полиморфизма гена ACE с легким, среднетяжелым течением заболевания и у умерших. А – Исследование полиморфизма гена ACE при легком и среднетяжелом течении заболевания в подгруппе пациентов в возрасте до 50 лет; Б – Исследование полиморфизма гена ACE, ассоциированного с развитием заболевания при легком, среднетяжелом течении заболевания всех возрастных групп; В – Исследование полиморфизма гена ACE, ассоциированного с развитием заболевания при легком течении и умерших во всех возрастных группах.

**Fig. 2.** Study of ACE gene polymorphism in patients with mild, moderate disease and in the deceased. А – Study of ACE gene polymorphism in mild and moderate disease in a subgroup of patients under the age of 50 years; Б – Study of ACE gene polymorphism associated with the development of the disease in mild and moderate disease in all age groups; В – Study of the ACE gene polymorphism associated with the development of the disease in mild cases and deaths of all age groups.

**Исследование полиморфизма гена UGT1A1, ассоциированного с развитием синдрома Жильбера (все исследованные больные)**  
**Study of polymorphism of the UGT1A1 gene associated with the development of Gilbert's syndrome (all patients studied)**

Генотипы гена UGT1A1 /Genotypes UGT1A1 gene	Группа больных с легким течением Group of patients with mild course n=100, абс. (%)	Группа умерших/Group of deceased n=115, абс. (%)	ОШ / (ДИ) odds ratios/ (confidence interval)	p / P
*1/*1 (или 6/6)	48 (47,5)	42 (36,5)	1,92 (1,07-3,42)	0,033
*1/*28 (или 6/7)	37 (36,6)	62 (53,9)		
*28/*28 (или 7/7)	16 (15,9)	11 (9,6)		0,1

с поправкой на возраст, пол, курение, сахарный диабет 2-го типа, дислипидемию. при исследовании смертности пациентов после коронароангиографии авторы показали, что вариант гена *UGT1A1* \*28 связан с более низкими показателями смертности. Защитный эффект *UGT1A1* \*28, вероятно, включает механизм, отличный от метаболизма билирубина [8].

Не исключено, что наличие полиморфизма 6/7 играет важную роль у тех пациентов, которые получали лечение моноклональными антителами.

Исходя из приведенных результатов, а также наших предыдущих исследований [12], следует, что течение заболевания и его исход зависит от многих причин, не всегда связанных только с проникновением вируса в клетки человека. Это может зависеть от того, как справится иммунная система с интервенцией вирусов, какие «слабые места» организма человека — сердечно-сосудистая, нервная, выделительная системы и т.д. — будут «избраны» в период заболевания для возникновения осложнений «de novo».

**Выводы:**

1. Наличие генотипа G/G гена IL6 почти в 5 раз снижает риск возникновения цитокинового шторма за счет значительного снижения цитокина в сыворотке крови, что характерно только для лиц моложе 50 лет. В более зрелом возрасте гибель наступает, видимо, также и по другим причинам (при наличии коморбидных заболеваний или возникновении их «de novo»).

2. Наличие генотипа D/D гена ACE встречается в 3,77 раза чаще в группе больных со среднетяжелым течением заболевания (до 50 лет). При более зрелом возрасте значение ОШ снижается до 2,64.

3. Среди погибших генотип D/D в 8 раз чаще встречается, чем в группе с легким течением заболевания.

4. При анализе полиморфизма гена *UGT1A1* (синдром Жильбера) гетерозигота \*1/\*28 (или 6/7) встречается почти в 2 раза чаще в группе умерших, чем в группе с легким течением заболевания.

**Литература**

**(п.п. 1; 2; 4-6; 8; 9 References)**

- Алибекова Г.Р., Мустафаев Н.Ш., Гусейнова И.М. Роль синергической связи ACE I/D и ACE2 G8790A полиморфизмов в этиологии COVID-19. *Биологические науки*. 2019; 744-83.
- Тополянская С.В. Роль интерлейкина 6 при старении и возраст-ассоциированных заболеваниях. *Клинист*. 2020; 14: 14-21.
- Барбараш, О.Л., Воевода М.И., Артамонова Г.В., Мулерова Т.А., Воропаева Е.Н., Максимов В.Н. и др. Генетические детерминанты артериальной гипертензии в двух национальных когортах Горной Шории *Терапевтический архив*. 2017; 9: 68-77.
- Смирнова М.Д., Фофанова Т.В., Хасанова З.Б., Овчинников А.Г., Агеев Ф.Т., Постнов А.Ю. Ассоциация клинической картины и выраженности гипертрофии левого желудочка с I/D полиморфизмом гена *ACE* у больных гипертрофической кардиомиопатией и гипертоническим сердцем. *Рос. кардиол. Журнал*. 2009; 76 (2): 65-9.
- Колюбаева С.Н., Кондратенко А.А., Алхаже К., Крюков Е.В., Чирский В.С., Качнов В.А. и др. Исследование полиморфизма генов HLA-DRB1 и IL28 у пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию (COVID-19) различной степени тяжести. *Гены и Клетки*. 2021; 163: 86-90.

**References**

- Scudellari, M. How the coronavirus infects our cells. Scientists are unpicking SARS-CoV-2's life cycle. *Nature*. 2021; 595: 640-4.
- Santos R.A., Sampaio W.O., Alzamora A.K., Motta-Santos D., Alenina N., Bader M., et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*. 2021; 98(1): 505-53.
- Alibekova G.R., Mustafaev N.Sh., Guseynova I.M. The role of the synergistic relationship between ACE I/D and ACE2 G8790A polymorphisms in the etiology of COVID-19. *Biologicheskije nauki*. 2019; 744-83. (in Russian)
- Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020; 46 (5): 846-8.
- Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(4): 420-2.
- Batra G., Latic T.G., Lindbäck J., Held C., Harvey D., White, Stewart R.A. H. Interleukin 6 and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease and Chronic Coronary Syndrome. *JAMA Cardiol*. 2021; 3079.

7. Topolyanskaya, S.V. The role of interleukin 6 in aging and age-associated diseases. *Klinitsist.* 2020; 14: 14-21. (in Russian)
8. Zulus B., Grünbacher G., Kleber M. E., März W., Renner W. The UGT1A1\*28 gene variant predicts long-term mortality in patients undergoing coronary angiography. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2018; 56(4): 560-64.
9. Nath A., Wang J., Huang R.S. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Targeted Therapeutics in Chronic Myeloid Leukemia. *Molecular diagnosis & therapy.* 2017; 21(6): 621-31.
10. Barbarash O.L., Voevoda M.I., Artamonova G.V., Mulerova T.A., Voropaeva E.N., Maksimov V.N., et al. Genetic determinants of arterial hypertension in two national cohorts of Gornaya Shoria. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2017; 9: 68-77. (in Russian)
11. Smirnova M.D., Fofanova T.V., Khasanova Z.B., Ovchinnikov A.G., Ageev F.T., Postnov A.Yu. Association of the clinical picture and severity of left ventricular hypertrophy with I/D polymorphism of the ACE gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive heart. *Ross. kardiol. Zhurnal.* 2009; 76(2): 65-9. (in Russian)
12. Kolyubaeva S.N., Kondratenko A.A., Alkhazhe K., Kryukov E.V., Chirskiy V.S., Kachnov V.A., et al. The study of the polymorphism of the HLA-DRB1 and IL28 genes in patients with a new coronavirus infection (COVID-19) of varying severity. *Geny i Kletki.* 2021; 163: 86-90. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Колобаева Светлана Николаевна**, доктор биол. наук, ст. науч. сотр., НИЦ «ВМА им. С.М. Кирова»,  
e-mail: ksnwma@mail.ru;

**Мякошина Лилия Анатольевна**, ст. лаборант, НИЦ «ВМА им. С.М. Кирова»;

**Нестерова Валентина Андреевна**, ст. лаборант, НИЦ «ВМА им. С.М. Кирова»;

**Богданов Дмитрий Сергеевич**, адъюнкт, каф. военно-морской терапии «ВМА им. С.М. Кирова»,  
e-mail: dimbog91@mail.ru;

**Чирский Вадим Семенович**, доктор мед. наук, проф., начальник каф. патологической анатомии  
«ВМА им. С.М. Кирова»;

**Глушаков Руслан Иванович**, доктор мед. наук, начальник научно-исследовательского отдела  
(медико-биологических исследований) «ВМА им. С.М. Кирова».

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-008.9-005.1-08-097-053

Сумеркина В.А., Головнева Е.С., Телешева Л.Ф.

## Роль нарушений гемостаза и гуморального иммунитета в развитии метаболического синдрома у лиц молодого возраста

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

**Введение.** Основными патогенетическими механизмами формирования метаболического синдрома (МС) являются инсулинорезистентность и дисфункция висцеральной жировой ткани. Роль изменений гемостаза, системного клеточного и гуморального иммунитета в прогрессии абдоминального ожирения (АО) и формировании МС не изучена. **Цель исследования** – изучение особенностей гемостаза и гуморального иммунитета при АО и МС у лиц молодого возраста.

**Методика.** Обследованы 244 пациента молодого возраста (18-45 лет) с АО и МС, распределённых в 4 группы: 1-я группа (группа сравнения) – условно здоровые лица без АО, избытка массы тела и дополнительных критериев МС ( $n=71$ ); 2-я группа (АО) – пациенты с изолированным АО ( $n=32$ ); 3-я ( $n=63$ ) – пациенты с АО и 1 из признаков МС (АО+1); 4-я ( $n=78$ ) – пациенты с МС. Определяли показатели тромбоцитарного, плазменного гемостаза, антикоагулянтной и фибринолитической систем, концентрацию цитокинов.

**Результаты.** При изолированном АО установлено повышение содержания фибриногена, снижение уровня антикоагулянта TFPI, повышение Д-димера. В группе пациентов АО+1 выявлено повышение фибриногена, РФМК, Д-димера, PAI-1 и удлинение эуглобулинового фибринолиза. При МС обнаружено повышение фибриногена и антикоагулянта TFPI, замедление эуглобулинового фибринолиза, угнетение активности плазминогена, рост концентрации PAI-1, РФМК, Д-димера. Содержание цитокинов IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$  в группах АО, АО+1 и МС было ниже, чем в группе сравнения. При МС установлено повышение концентрации IL-6, IL-10 и MCP-1.

**Заключение.** У лиц молодого возраста с изолированным АО зафиксирована активация коагуляционного гемостаза. Прогрессирование АО сочетается с угнетением активности фибринолитической системы. Охарактеризованы изменения антикоагулянтного потенциала у лиц молодого возраста с АО и МС – снижение уровня TFPI при изолированном АО и повышение – при МС. Нарушения гуморального иммунитета у лиц молодого возраста фиксируются уже при изолированном АО и проявляются снижением уровня цитокинов IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$ . Описанные изменения характерны в том числе для лиц с комбинацией АО с одним из компонентов МС, а при МС сочетаются с повышением уровня IL-6, IL-10 и MCP-1.

**Ключевые слова:** метаболический синдром; абдоминальное ожирение; гемостаза; цитокины

**Для цитирования:** Сумеркина В.А., Головнева Е.С., Телешева Л.Ф. Роль нарушений гемостаза и гуморального иммунитета в развитии метаболического синдрома у лиц молодого возраста. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 36-46.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.36-46

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Сумеркина В.А., Головнева Е.С., Телешева Л.Ф.; сбор и обработка материала – Сумеркина В.А.; подготовка иллюстративного материала – Сумеркина В.А.; статистическая обработка материала – Сумеркина В.А.; написание текста – Сумеркина В.А., Головнева Е.С.; редактирование – Телешева Л.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

**Для корреспонденции:** Сумеркина Вероника Андреевна, e-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.09.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Sumerkina V.A., Golovneva E.S., Telesheva L.F.

## The role of disordered hemostasis and humoral immunity in the development of metabolic syndrome in young adults

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

The major pathogenetic mechanisms of metabolic syndrome (MetS) are insulin resistance and visceral adipose tissue dysfunction. The role of changes in hemostasis and systemic cellular and humoral immunity in the progression of abdominal obesity (AO) and the development of MetS has not been studied. **Aim:** To study the features of hemostasis and humoral immunity in AO and MetS in young adults.

**Methods.** 244 young adults (18-45 years old) with AO and MetS were studied. The patients were divided into 4 groups: group 1 (comparison group), healthy individuals without AO, excessive body weight or additional criteria for MetS ( $n=71$ ); group 2 (AO), patients with isolated AO ( $n=32$ ); group 3 (AO+1), patients with AO and one criterion for MetS ( $n=63$ ); and group 4 (MetS), patients with MetS ( $n=78$ ). Parameters of platelet hemostasis, coagulation, anticoagulant and fibrinolytic systems, and cytokines concentrations were determined. Statistical analyses were performed.

**Results.** Patients with isolated AO had increased concentrations of fibrinogen and D-dimer and decreased concentrations of the anticoagulant TFPI. Patients of group AO+1 had increased concentrations of fibrinogen, SFMC, D-dimer, and PAI-1 and a prolonged euglobulin clot lysis time. Patients with MetS had increased fibrinogen, PAI-1, SFMC, D-dimer and the anticoagulant TFPI, prolonged fibrinolysis, and inhibited plasminogen activity. Changes in cytokines in all groups were characterized by decreased levels of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  whereas in MetS, these changes were combined with increased levels of IL-6, IL-10, and MCP-1.

**Conclusions.** 1. The activation of coagulation hemostasis was observed in young adults with isolated AO. The progression of AO was associated with inhibition of the fibrinolytic system activity. In young people with AO and MetS, the changes in the anticoagulant potential were evident as decreased TFPI in isolated AO and increased TFPI in MetS. 2. Changes in humoral immunity in young adults were observed already in isolated AO and were manifested by decreased cytokines IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$ . These changes are also typical for individuals with a combination of AO with one of the MetS components, and in the MetS group they were associated with increased levels of IL-6, IL-10 and MCP-1.

**Keywords:** metabolic syndrome; abdominal obesity; hemostasis; cytokines

**For citation:** Sumerkina V.A., Golovneva E.S., Telesheva L.F. The role of disordered hemostasis and humoral immunity in the development of metabolic syndrome in young adults. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 36-46. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.36-46

**Author's contribution:** concept and design of the study – Sumerkina V.A., Golovneva E.S., Telesheva L.F.; collection and processing of material – Sumerkina V.A.; preparation of illustrative material – Sumerkina V.A.; statistical processing – Sumerkina V.A.; text writing – Sumerkina V.A., Golovneva E.S.; editing – Telesheva L.F. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** **Veronika A. Sumerkina**, PhD, Leading Researcher of Central Research Laboratory, FSBEI HE «South-Ural State Medical University» MOH Russia, 64, Vorovskogo st., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation, e-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

### Information about the authors:

Sumerkina V.A., <https://orcid.org/0000-0003-4842-0875>

Golovneva E.S., <https://orcid.org/0000-0002-6343-7563>

Telesheva L.F., <https://orcid.org/0000-0002-7884-9675>

**Financing.** The study had no sponsorship.

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

Received 09.09.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

### Список сокращений:

МС – метаболический синдром

ИР – инсулинорезистентность

ВЖТ – висцеральная жировая ткань

АО – абдоминальное ожирение

VAI – индекс висцерального ожирения

РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы

РАI – ингибитор активатора плазминогена I типа

TFPI – ингибитор пути тканевого фактора

MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1

TyG – индекс инсулинорезистентности

## Введение

Метаболический синдром (МС) – кластер ведущих факторов кардиометаболического риска [1]. В 1988 г. G. Reaven показал, что основным механизмом патогенеза МС является инсулинорезистентность (ИР) [2]. Вместе с тем существуют альтернативные научные гипотезы, свидетельствующие о центральной роли висцеральной жировой ткани (ВЖТ) в регуляции метаболизма [3]. Доказано, что избыток ВЖТ и сопутствующие структурно-функциональные нарушения вызывают повышение метаболической активности адипоцитов и изменение профиля синтезируемых жировыми клетками медиаторов. Указанные процессы относят к дисфункции ВЖТ [4, 5]. В качестве маркера нарушения функции и распределения жировой ткани используют индекс висцерального ожирения VAI (visceral adiposity index), учитывающий окружность талии, индекс массы тела, концентрацию глюкозы и триглицеридов [6, 7].

В настоящее время достигнуты успехи в понимании механизмов развития отдельных компонентов МС, в то же время этиология и патогенез МС полностью не изучены. Так, патогенетические закономерности возникновения и развития временных связей между АО и остальными компонентами МС до сих пор не раскрыты. Существуют дискуссионные вопросы о причинно-следственных отношениях различных компонентов МС и их патофизиологической интеграции. Кроме того, механизмы инициирования артериальной гипертензии, дислипидемии и ИР при АО и последующей их прогрессии изучены не достаточно.

Ранее нами было показано, что переход АО в МС развивается на фоне прогрессирования ИР, дисфункции ВЖТ и дисбаланса адипокинов (лептин и адипонектин) и сочетается с нарастанием количества жировой ткани (от избыточной массы тела при АО до ожирения I степени при МС) [8]. Известно, что каждый из компонентов МС (артериальная гипертензия, гипергликемия, дислипидемия) ассоциирован с повреждением эндотелия и гемостазиологическими нарушениями [9], а наличие у пациента ожирения и МС повышает риск тромботических событий. Вопрос о роли нарушений гемостаза в формировании МС в научном сообществе не рассматривался.

МС является хроническим воспалительным процессом, тем не менее большинство современных исследований в области иммунологии ожирения сосредоточено на особенностях развития локальных изменений в жировой ткани [10, 11]. В качестве ведущих триггеров воспаления при ожирении рассматривают тканевую гипоксию, механический стресс, накопление сво-

бодных жирных кислот [12]. Механизм формирования иммунной дисфункции при расстройствах метаболизма ассоциирован с нарушением процессов межклеточной кооперации и взаимодействия различных звеньев иммунной системы. Данные литературы об особенностях системного гуморального и клеточного иммунитета при МС неоднозначны [13, 14]. Наличие локальных иммунных изменений в жировой ткани при её избытке позволяет выдвинуть предположение о том, что системные нарушения клеточного и гуморального иммунитета могут быть зафиксированы уже при изолированном АО и приобретают более выраженный характер при длительном течении АО и его прогрессии в МС. Однако в литературе не обсуждается вопрос первичности иммунных нарушений при АО и МС.

**Цель исследования** – изучение особенностей гемостаза и гуморального иммунитета при АО и МС у лиц молодого возраста.

## Методика

Исследование выполнено на 244 лицах обоего пола 18–45 лет, обратившихся на амбулаторный приём к терапевту или кардиологу в МБУЗ ГKB №11 г. Челябинска в 2013–2017 гг. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ МЗ РФ (протокол № 11 от 09.11.2013). Критерии включения: наличие АО в соответствии с Национальными рекомендациями «Диагностика и лечение метаболического синдрома» Российского кардиологического общества, 2009 [1] – окружность талии >80 см у женщин и >94 см у мужчин, информированное согласие пациента. Критерии исключения: беременность, лактация; синдром поликистозных яичников; сахарный диабет и другие эндокринные заболевания на момент обследования или в анамнезе; симптоматические артериальные гипертензии, III стадия артериальной гипертензии, декомпенсированные сердечно-сосудистые заболевания; венозный тромбоз на момент обследования или в анамнезе; онкологические заболевания на момент обследования или в анамнезе; туберкулёз; ВИЧ-инфекция; парентеральные вирусные гепатиты; психические заболевания; острые и хронические воспалительные заболевания в период обострения; приём гормональных, антитромботических, антигипертензивных препаратов; отказ от участия в исследовании.

Пациенты были распределены в 4 группы: группа сравнения ( $n=71$ ) – пациенты без АО, избытка массы тела и дополнительных критериев МС (условно здоровые лица); группа АО ( $n=32$ ) – пациенты с АО без дополнительных критериев МС (изолированное АО); группа АО+1 ( $n=63$ ) – пациенты с сочетанием

АО и 1 из дополнительных критериев МС; группа МС ( $n=78$ ) – пациенты с МС. В соответствии с Национальными рекомендациями «Диагностика и лечение метаболического синдрома» Российского кардиологического общества, 2009 МС диагностировали при сочетании АО (окружность талии  $>80$  см у женщин и  $>94$  см у мужчин) с любыми 2 дополнительными критериями: артериальная гипертензия (артериальное давление  $>140/90$  мм рт. ст.); повышение концентрации триглицеридов ( $>1,7$  ммоль/л); снижение концентрации холестерина ЛПВП (ХсЛПВП) ( $<1,0$  ммоль/л у мужчин;  $<1,2$  ммоль/л у женщин); повышение концентрации холестерина ЛПНП (ХсЛПНП) ( $>3,0$  ммоль/л); повышение концентрации глюкозы натощак ( $> 6,1$  ммоль/л).

Лабораторные исследования выполнены по международным правилам работы с биоматериалом людей. Исследование системы гемостаза проводили в плазме крови, стабилизированной цитратом натрия 3,2%. Показатели агрегации тромбоцитов определяли в богатой тромбоцитами плазме на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ЛА 230-2 (Биола, Россия): степень агрегации – турбидиметрическим оптическим методом по Борну, размер агрегатов – флукуационным методом З.А. Габбасова [15]. Изучали спонтанную и индуцированную агрегацию тромбоцитов. В качестве индукторов использовали раствор адреналина в конечной концентрации 60 мкМ, раствор АДФ в конечной концентрации 10 мкМ и раствор коллагена в конечной концентрации 2 мг/мл (Технология-Стандарт, Россия). Определение показателей гемостаза (активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), международное нормализованное отношение (МНО), тромбиновое время, фибриноген, активность антитромбина III, активность плазминогена, Хагеман-зависимый фибринолиз, эуглобулиновый фибринолиз, растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК)) выполняли в соответствии с рекомендациями производителей наборов реактивов (Технология-Стандарт, Россия) на автоматическом коагулометре СА-560 (Sysmex, Япония). Уровень Д-димера (Technoclone, Австрия) определяли в сыворотке крови на микропланшетном ридере 680 (Bio-Rad, США). Содержание ингибитора активатора плазминогена 1 типа (РАI-1) (Bender MedSystems, Австрия) и ингибитора пути тканевого фактора (ТФPI) (AssayPro, Чехия) определяли в сыворотке крови на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе Analette Biochem (НТИ, США).

Концентрацию цитокинов IL-1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10; IFN- $\alpha$ ,  $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  определяли в сыворотке крови на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal Lab

(Adaltis, Италия). МСР-1 определяли на иммуноферментном анализаторе Вектор-Бест, Россия.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 2011, США). Нормальность распределения данных определяли с помощью описательной статистики, графически и статистических критериев Лиллиефорса и Шапиро-Уилка. Количественные признаки выражали в виде среднего значения и среднеквадратичного отклонения  $M \pm \sigma$  (при нормальном распределении признака). При описании данных, распределение которых отличалось от нормального, использованы медиана (Me), первый и третий квартили [ $Q_1$ ;  $Q_3$ ]. Для определения различия сравниваемых независимых выборок использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, апостериорное сравнение групп выполнено с помощью критерия Манна-Уитни. Статистические взаимосвязи изучали при помощи непараметрических методов корреляции рангов по Спирмену и Кенделу. Для всех видов анализа критическим уровнем значимости считали значения  $p < 0,05$ .

## Результаты

При изучении особенностей гемостаза в группе пациентов с изолированным АО были установлены изменения плазменного (повышение уровня фибриногена) и антикоагулянтного (снижение ТФPI) звеньев в сочетании с тромбинемией и активацией фибринолиза, о чём свидетельствует повышение Д-димера (табл. 1). В группе пациентов АО+1 наблюдались гиперкоагуляционные изменения: повышение фибриногена, РФМК и Д-димера, удлинение времени эуглобулинового фибринолиза, увеличение концентрации РАI-1.

У пациентов с МС обнаружено повышение концентрации фибриногена и антикоагулянта ТФPI на фоне тромбинемии в сочетании с изменениями фибринолитической системы (замедление эуглобулинового фибринолиза, угнетение активности плазминогена, рост концентрации РАI-1, Д-димера).

В исследуемых группах у пациентов мы не выявили изменений в тромбоцитарном звене.

Для изучения взаимосвязи состояния гемостаза и компонентов МС, инсулинорезистентности, дисфункции ВЖТ и профиля адипокинов был выполнен корреляционный анализ (табл. 2).

У пациентов с изолированным АО статистически значимых корреляционных связей между вышеперечисленными параметрами установлено не было.

Таблица 1/ Table 1

Показатели гемостаза у пациентов с АО и МС,  $M \pm \sigma$ ; Me ( $Q_{25\%} - Q_{75\%}$ )

Hemostasis indicators in patients with AO and MetS,  $M \pm \sigma$ ; Me ( $Q_{25\%} - Q_{75\%}$ )

Показатель Indicator	Группа сравнения (группа 1, n=71) Comparison group (group 1, n=71)	АО (группа 2, n=32) АО (group 2, n=32)	АО+1 (группа 3, n=63) АО+1 (group 3, n=63)	МС (группа 4, n=78) MetS (group 4, n=78)	Статистическая зна- чимость различий Statistical significance of differences p / P
Спонтанная агрегация, у.е. Spontaneous aggregation, units	0,24 (0,07-0,37)	0,32 (0,17-0,48)	0,27 (0,14-0,54)	0,24 (0,12-0,41)	n/з n/s
АДФ-индуцированная агрегация, % ADP-induced aggregation, %	66±10	64±10	66±13	64±10	n/з n/s
АДФ-индуцированная агрегация, у.е. ADP-induced aggregation, units	14,7 (11,0-19,4)	14,1 (10,1-16,9)	15,1 (12,5-18,1)	14,1 (10,4-17,2)	n/з n/s
Адреналин-индуцированная агрегация, % Adrenalin-induced aggregation, %	59±13	57±11	56±14	56±13	n/з n/s
Адреналин-индуцированная агрегация, у.е. Adrenalin-induced aggregation, units	12,9 (10,4-15,6)	11,4 (10,0-13,3)	12,7 (10,4-16,5)	11,9 (9,7-15,5)	n/з n/s
Коллаген-индуцированная агрегация, % Collagen-induced aggregation, %	70±11	70±10	68±12	68±11	n/з n/s
Коллаген-индуцированная агрегация, у.е. Collagen-induced aggregation, units	15,4 (12,5-17,8)	12,9 (10,5-14,8)	13,8 (12,1-17,0)	14,1 (10,4-17,0)	n/з n/s
АПТВ, с АРТТ, s	36,8±4,4	36,5±3,5	36,1±5,3	36,1±5,3	n/з n/s
МНО INR	1,0±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	n/з n/s
Тромбиновое время, с Thrombin time, s	16,7 (15,7-17,7)	16,4 (15,6-17,3)	16,4 (15,6-17,2)	16,6 (16,0-17,7)	n/з n/s
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	3,2 (2,9-3,9)	3,8 (3,3-4,4)	3,8 (3,2-4,1)	4,0 (3,8-4,8)	$P_{1-2}=0,006$ $P_{1-3}=0,002$ $P_{1-4}<0,0001$
Активность антитромбина III, % Antithrombin III activity, %	104 (94-111)	108 (94-112)	105 (95-111)	104 (95-111)	n/з n/s
ТФPI, нг/мл TFPI, ng/ml	93 (45-137)	55 (38-89)	103 (44-133)	123 (93-163)	$P_{1-2}=0,040$ $P_{1-4}=0,041$ $P_{2-4}=0,002$
Хагеман-зависимый фибринолиз, мин Hageman dependent fibrinolysis, min	8 (7-11)	9 (7-10)	10 (8-11)	10 (8-12)	n/з n/s
Эуглобулиновый фибринолиз, мин Euglobulin fibrinolysis, min	200 (180-280)	240 (200-265)	250 (200-290)	280 (220-310)	$P_{1-3}=0,010$ $P_{1-4}=0,0001$ $P_{2-4}=0,016$
РФМК, мг/% SFMC, mg/%	4,0 (3,0-5,0)	4,8 (3,0-7,0)	5,0 (3,0-7,0)	6,0 (4,5-8,0)	$P_{1-3}=0,008$ $P_{1-4}<0,0001$ $P_{2-4}=0,025$ $P_{3-4}=0,014$
Активность плазминогена, % Plasminogen activity, %	117 (100-130)	118 (101-132)	111 (98-126)	102 (92-117)	$P_{1-4}=0,003$ $P_{2-4}=0,021$
Д-димер, нг/мл D-dimer, ng/ml	41 (25-56)	66 (29-111)	66 (38-155)	60 (40-105)	$P_{1-2}=0,047$ $P_{1-3}=0,032$ $P_{1-4}=0,048$
РАI-1, нг/мл РАI-1, ng/ml	304,6 (223,6-413,0)	348,8 (227,9-478,2)	433,9 (276,1-587,5)	467,6 (309,5-626,9)	$P_{1-3}=0,005$ $P_{1-4}=0,001$ $P_{2-4}=0,040$

Примечание: н/з – различия статистически не значимые ( $p>0,05$ ).

Note: n/s – the differences are statistically no significant ( $p>0,05$ ).

В группе АО+1 была определена взаимосвязь между наличием артериальной гипертензии и концентрацией Д-димера, между соотношением лептин / адипонектин и уровнем РФМК. Повышенный уровень фибриногена при МС был ассоциирован с триглицеридами, адипонектином, индексом инсулинорезистентности TuG. Установлена положительная корреляция между маркером тромбинемии РФМК, гликозилированным гемоглобином и наличием артериальной гипертензии. Д-димер коррелировал с соотношением лептин/адипонектин. Установлена прямая зависимость увеличения тромбинового времени с возрастанием концентрации ХсЛПВП.

Анализ уровня цитокинов показал снижение IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  относительно группы сравнения у пациентов с изолированным АО, а также в группах АО+1 и МС (табл. 3). При МС установлено повышение концентрации IL-6 и IL-10 относительно всех других исследуемых групп. Уровень MCP-1 при МС был выше, чем в группе сравнения и при изолированном АО. Концентрация цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN- $\alpha$  и TNF- $\alpha$  не имела статистически значимых межгрупповых различий.

Был выполнен корреляционный анализ между концентрацией цитокинов и компонентами МС, инсулинорезистентностью, дисфункцией ВЖТ, профилем адипокинов (табл. 4).

Таблица 2/ Table 2

**Корреляция гемостазиологических показателей, компонентов МС, ИР и адипокинов у пациентов с АО и МС, r<sub>s</sub>****Correlations of hemostasis indicators with MetS components, insulin resistance, profile of adipokines in patients with AO and MetS, r<sub>s</sub>**

Показатель, группа Indicator, group	Тромбиновое время, с / Thrombin time, s	Фибриноген, г/л / Fibrinogen, g/l	РФМК, мг/% / SFMC, mg/%	Д-димер, нг/мл / D-dimer, ng/ml	
HbA1C, %	АО+1	-0,06; <i>p</i> =0,669	0,02; <i>p</i> =0,901	0,11; <i>p</i> =0,406	0,03; <i>p</i> =0,843
	МС / MetS	0,16; <i>p</i> =0,173	0,47; <i>p</i> =0,054	<b>0,29;</b> <b><i>p</i>=0,011</b>	-0,02; <i>p</i> =0,867
ХсЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/l	АО+1	0,11; <i>p</i> =0,415	0,17; <i>p</i> =0,193	0,08; <i>p</i> =0,534	0,18; <i>p</i> =0,163
	МС / MetS	<b>0,31;</b> <b><i>p</i>=0,007</b>	0,19; <i>p</i> =0,094	0,21; <i>p</i> =0,073	-0,06; <i>p</i> =0,634
Триглицериды, ммоль/л Triglyceride, mmol /l	АО+1	0,06; <i>p</i> =0,651	-0,05; <i>p</i> =0,713	0,05; <i>p</i> =0,726	-0,12; <i>p</i> =0,346
	МС / MetS	0,14; <i>p</i> =0,230	<b>0,25;</b> <b><i>p</i>=0,031</b>	-0,16; <i>p</i> =0,180	0,04; <i>p</i> =0,752
Наличие артериальной гипертензии Hypertension	АО+1	0,15; <i>p</i> =0,248	0,02; <i>p</i> =0,853	0,09; <i>p</i> =0,474	<b>0,29;</b> <b><i>p</i>=0,026</b>
	МС / MetS	0,42; <i>p</i> =0,054	0,12; <i>p</i> =0,284	<b>0,23;</b> <b><i>p</i>=0,048</b>	0,15; <i>p</i> =0,890
TuG – индекс инсулинорезистентности Insulin resistance index	АО+1	0,11; <i>p</i> =0,409	-0,02; <i>p</i> =0,885	0,08; <i>p</i> =0,521	-0,12; <i>p</i> =0,344
	МС / MetS	0,14; <i>p</i> =0,230	<b>0,28;</b> <b><i>p</i>=0,016</b>	-0,11; <i>p</i> =0,348	0,05; <i>p</i> =0,650
Адипонектин, мкг/мл Adiponectin, mcg/ml	АО+1	-0,07; <i>p</i> =0,618	0,06; <i>p</i> =0,651	-0,07; <i>p</i> =0,617	0,05; <i>p</i> =0,679
	МС / MetS	-0,07; <i>p</i> =0,641	<b>-0,39; <i>p</i>=0,005</b>	-0,04; <i>p</i> =0,771	-0,06; <i>p</i> =0,669
Лептин / адипонектин, нг/мкг Leptin / Adiponectin, ng/mcg	АО+1	0,16; <i>p</i> =0,199	0,25; <i>p</i> =0,055	<b>0,27;</b> <b><i>p</i>=0,040</b>	-0,22; <i>p</i> =0,089
	МС / MetS	0,18; <i>p</i> =0,222	0,39; <i>p</i> =0,054	0,05; <i>p</i> =0,730	<b>0,32;</b> <b><i>p</i>=0,026</b>

**Примечание.** Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляционные связи (*p*<0,05).

**Note.** Statistically significant correlations are highlighted (*p*<0,05).

У пациентов с изолированным АО не зафиксировано статистически значимых ассоциаций уровней цитокинов с другими исследуемыми параметрами.

В группе пациентов АО+1 определена положительная корреляционная связь уровня IL-4 и ХсЛПВП, отрицательная взаимосвязь между концентрацией IL-4 и наличием артериальной гипертензии.

У пациентов с МС концентрация цитокинов взаимосвязана с компонентами МС, маркерами ИР, дисфункции ВЖТ. Уровень IL-4 положительно коррелирует с антиатерогенной фракцией ХсЛПВП и отрицательно с концентрацией лептина и наличием артериальной гипертензии. Концентрация IL-6 положительно взаимосвязана с HbA1C. Содержание IFN-γ разнонаправленно взаимосвязано с атерогенной фракцией холестерина

ХсЛПВП (отрицательная корреляционная связь) и антиатерогенной фракцией холестерина ХсЛПВП (положительная корреляционная связь), а также с лептином. Определены взаимосвязи МСР-1 с концентрацией глюкозы, триглицеридов, маркерами инсулинорезистентности (Тг/ХсЛПВП и TuG) и дисфункции ВЖТ (VAI).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют об ассоциации содержания цитокинов с гемостазиологическими изменениями в группе пациентов с МС. Уровни IL-2 и IL-4 были отрицательно взаимосвязаны с эуглобулиновым фибринолизом ( $r_s = -0,32$ ;  $p = 0,008$  и  $r_s = -0,24$ ;  $p = 0,046$ , соответственно). Повышенный уровень IL-6 у пациентов с МС был ассоциирован с маркером тромбинемии РФМК ( $r_s = 0,352$ ;  $p = 0,034$ ).

Таблица 3/Table 3

**Концентрация цитокинов у пациентов с АО и МС, Me (Q<sub>25%</sub> – Q<sub>75%</sub>)**  
**Concentration of cytokines in patients with AO and MetS, Me (Q<sub>25%</sub> – Q<sub>75%</sub>)**

Показатель, пг/мл Indicator, pg/ml	Группа сравнения (группа 1, n=71) / Comparison group (group 1, n=71)	АО (группа 2, n=32) / АО (group 2, n=32)	АО+1 (группа 3, n=63) / АО+1 (group 3, n=63)	МС (группа 4, n=78) / MetS (group 4, n=78)	Статистическая значимость различий / Statistical significance of differences p / P
IL-1β	3,0 (2,2-4,3)	2,3 (1,8-2,9)	4,6 (2,5-22,5)	3,2 (2,2-5,3)	н/з n/s
IL-2	9,8 (8,6-10,2)	4,2 (3,3-7,3)	4,0 (3,1-6,0)	4,2 (3,8-8,5)	P <sub>1-2</sub> < 0,0001 P <sub>1-3</sub> < 0,0001 P <sub>1-4</sub> < 0,0001
IL-4	2,9 (2,7-3,1)	1,1 (0,6-2,6)	1,0 (0,7-1,3)	0,9 (0,7-2,8)	P <sub>1-2</sub> < 0,0001 P <sub>1-3</sub> < 0,0001 P <sub>1-4</sub> < 0,0001
IL-6	3,6 (2,8-4,6)	2,7 (1,5-4,5)	2,3 (1,8-3,6)	5,1 (3,2-7,1)	P <sub>1-4</sub> = 0,012 P <sub>2-4</sub> = 0,007 P <sub>3-4</sub> = 0,0001
IL-8	44,3 (23,3-95,3)	58,3 (26,3-129,1)	86,7 (25,9-95,6)	55,2 (18,4-142,0)	н/з n/s
IL-10	4,9 (4,1-5,6)	4,7 (3,3-5,0)	4,5 (4,0-6,9)	5,7 (5,0-7,0)	P <sub>1-4</sub> < 0,001 P <sub>2-4</sub> = 0,002 P <sub>3-4</sub> = 0,026
IFN-α	12,5 (11,1-13,9)	11,1 (9,4-13,9)	9,9 (7,5-15,4)	11,2 (7,5-14,8)	н/з n/s
IFN-γ	21,9 (20,7-22,5)	7,1 (5,0-18,8)	6,2 (5,2-7,1)	5,9 (5,0-21,0)	P <sub>1-2</sub> < 0,0001 P <sub>1-3</sub> < 0,0001 P <sub>1-4</sub> < 0,0001
МСР-1	139,2 (101,5-190,9)	142,9 (112,2-167,8)	165,0 (127,4-180,2)	164,3 (132,1-195,5)	P <sub>1-4</sub> = 0,030 P <sub>2-4</sub> = 0,013
TNF-α	5,2 (4,1-6,4)	5,3 (3,0-6,4)	5,6 (3,0-5,9)	5,4 (3,8-6,6)	н/з n/s

**Примечание.** н/з – различия статистически не значимые ( $p > 0,05$ ).  
**Note.** n/s - The differences are statistically no significant ( $p > 0,05$ ).

Таблица 4/Table 4

Корреляция цитокинов с компонентами МС, инсулинорезистентностью, профилем адипокинов у пациентов с АО и МС, r<sub>s</sub>  
 Correlations of cytokines with MetS components, insulin resistance, profile of adipokines in patients with AO and MetS, r<sub>s</sub>

Показатель, группа Indicator, group		IL-4, pg/ml	IL-6, pg/ml	IFN- $\gamma$ , pg/ml	MCP-1, pg/ml
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	АО+1	0,06; <i>p</i> =0,777	0,19; <i>p</i> =0,265	-0,19; <i>p</i> =0,375	-0,07; <i>p</i> =0,754
	МС / MetS	-0,04; <i>p</i> =0,764	0,14; <i>p</i> =0,420	0,01; <i>p</i> =0,902	<b>0,35;</b> <b><i>p</i>=0,003</b>
HbA1C, %	АО+1	0,19; <i>p</i> =0,330	0,01; <i>p</i> =0,940	0,40; <i>p</i> =0,059	-0,08; <i>p</i> =0,725
	МС / MetS	0,51; <i>p</i> =0,056	<b>0,42;</b> <b><i>p</i>=0,010</b>	0,42; <i>p</i> =0,052	0,18; <i>p</i> =0,130
ХсЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/l	АО+1	<b>0,62;</b> <b><i>p</i>=0,001</b>	0,21; <i>p</i> =0,210	0,33; <i>p</i> =0,128	0,27; <i>p</i> =0,234
	МС / MetS	<b>0,67;</b> <b><i>p</i>&lt;0,0001</b>	0,42; <i>p</i> =0,051	<b>0,67;</b> <b><i>p</i>&lt;0,0001</b>	0,01; <i>p</i> =0,907
ХсЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/l	АО+1	-0,42; <i>p</i> =0,059	0,12; <i>p</i> =0,472	-0,19; <i>p</i> =0,388	0,31; <i>p</i> =0,166
	МС / MetS	-0,21; <i>p</i> =0,077	-0,09; <i>p</i> =0,601	<b>-0,29;</b> <b><i>p</i>=0,015</b>	-0,04; <i>p</i> =0,742
Триглицериды, ммоль/л Triglyceride, mmol/l	АО+1	0,31; <i>p</i> =0,119	0,19; <i>p</i> =0,254	-0,08; <i>p</i> =0,720	0,13; <i>p</i> =0,563
	МС / MetS	0,35; <i>p</i> =0,053	0,21; <i>p</i> =0,212	0,39; <i>p</i> =0,056	<b>0,39;</b> <b><i>p</i>=0,0007</b>
Тг/ХсЛПВП Tg/HDL	АО+1	0,01; <i>p</i> =0,951	0,03; <i>p</i> =0,871	-0,04; <i>p</i> =0,849	0,04; <i>p</i> =0,870
	МС / MetS	0,02; <i>p</i> =0,843	0,13; <i>p</i> =0,451	0,01; <i>p</i> =0,958	<b>0,28;</b> <b><i>p</i>=0,023</b>
ТуГ – индекс инсулинорезистентности Insulin resistance index	АО+1	0,32; <i>p</i> =0,110	0,25; <i>p</i> =0,123	0,07; <i>p</i> =0,754	0,16; <i>p</i> =0,478
	МС / MetS	0,31; <i>p</i> =0,008	0,27; <i>p</i> =0,124	0,34; <i>p</i> =0,054	<b>0,35;</b> <b><i>p</i>=0,003</b>
VAI – индекс висцерального ожирения Visceral heat index	АО+1	0,07; <i>p</i> =0,722	0,12; <i>p</i> =0,496	-0,07; <i>p</i> =0,743	0,07; <i>p</i> =0,777
	МС / MetS	-0,04; <i>p</i> =0,755	0,15; <i>p</i> =0,399	-0,07; <i>p</i> =0,590	<b>0,27;</b> <b><i>p</i>=0,026</b>
Лептин, нг/мл Leptin, ng/ml	АО+1	0,29; <i>p</i> =0,146	0,53; <i>p</i> =0,057	0,26; <i>p</i> =0,235	0,47; <i>p</i> =0,052
	МС / MetS	<b>-0,31;</b> <b><i>p</i>=0,016</b>	0,091; <i>p</i> =0,640	<b>-0,27;</b> <b><i>p</i>=0,044</b>	0,05; <i>p</i> =0,710
Наличие артериальной гипертензии Hypertension	АО+1	<b>-0,52;</b> <b><i>p</i>=0,006</b>	0,05; <i>p</i> =0,745	0,09; <i>p</i> =0,571	-0,26; <i>p</i> =0,180
	МС / MetS	<b>-0,41;</b> <b><i>p</i>=0,0004</b>	-0,28; <i>p</i> =0,010	-0,25; <i>p</i> =0,054	-0,21; <i>p</i> =0,080

**Примечание.** Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляционные связи ( $p < 0,05$ ).

**Note.** Statistically significant correlations are highlighted ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Таким образом, у пациентов молодого возраста с АО и МС определены гиперкоагуляционные изменения. Нарушения гемостаза ассоциированы с компонентами МС и выявляются уже при изолированном АО. Корреляция ХсЛПВП и тромбинового времени может быть связана с ингибированием ЛПВП тканевого фактора и повышением антикоагулянтной активности активированных белков системы протеина С (белков С и S) [16]. Ассоциация фибриногена с традиционными факторами сердечно-сосудистого риска: избыточной массой тела, артериальной гипертензией, частотой сердечных сокращений, триглицеридами, ХсЛПВП, гликозилированным гемоглобином, С-реактивным белком и другими хорошо известна и подтверждена в различных популяциях [17]. В нашем исследовании выявлена положительная взаимосвязь фибриногена с триглицеридами, индексом инсулинорезистентности TuG, соотношением лептин / адипонектин и отрицательная – с адипонектином. По мнению большинства исследователей, фибриноген является в большей степени маркером воспаления, чем прокоагулянтного состояния, в то же время связь его с висцеральным ожирением, ИР и другими компонентами МС очевидна [9]. Тромбинемия, установленная нами во всех группах пациентов, с одной стороны, усиливает образование фибриногена, а с другой – активирует систему фибринолиза. Уровень тромбинемии в нашей работе был ассоциирован с наличием артериальной гипертензии, гликемией и ИР. Аналогичные данные получены и другими авторами [18, 19]. При увеличении количества жировой ткани в адипоцитах повышается экспрессия VII фактора свёртывания, что приводит к активации тромбина. Тромбин, в свою очередь повышает экспрессию МСР-1 в адипоцитах с последующей макрофагальной инфильтрацией и продукцией провоспалительных цитокинов. В совокупности вышеописанные процессы вызывают ИР [20]. Повышение активности антикоагулянтной системы носит компенсаторно-приспособительный характер в условиях активации гемостаза, однако возрастание уровня TFPI, вероятно, недостаточно для ингибирования тромбинемии. Многие исследователи отмечают, что при развитии метаболического синдрома наиболее заметны нарушения фибринолитической системы, что и было показано в данной работе. В настоящее время известно, что недостаточность фибринолиза при МС обусловлена повышением уровня PAI-1. Данные настоящего исследования хорошо согласуются с этим утверждением, поскольку

прогрессирование МС сопровождалось повышением PAI-1 (в группе АО – на 14%, в группе АО+1 – уже на 43%, а в группе МС – на 54% по сравнению с первой группой).

Ранее нами были определены особенности системного клеточного иммунитета при АО и МС [8]. Изменения клеточного иммунитета при изолированном АО и при комбинации АО с одним из компонентов МС характеризуются повышением числа лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов и снижением лимфоцитов в сочетании с экспрессией на поверхности Т-лимфоцитов маркеров активации HLADR+. При МС описанные изменения сопровождаются повышением числа активированных Т-лимфоцитов субпопуляции CD3+25+ и ростом количества В-лимфоцитов. Число лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов взаимосвязано с такими компонентами МС, как индекс массы тела, уровень гликемии, инсулина и ИР, концентрация различных липидных фракций, лептина, а также индексом VAI, отражающим дисфункцию ВЖТ. Появление при АО и МС активированных лимфоцитов в периферической крови взаимосвязано с факторами кардиометаболического риска (избытком жировой ткани, дислипидемией, гиперлептинемией, гиперинсулинемией и ИР).

Известно, что уровень провоспалительных цитокинов у пациентов с ожирением и МС повышен. Одним из источников IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  являются макрофаги с провоспалительным фенотипом M1, присутствующие в ВЖТ [21]. В нашем исследовании в группе пациентов с МС была повышена концентрация IL-6, определена её взаимосвязь с гликемией, тромбинемией и фибринолизом. Нами не было зафиксировано повышение концентрации TNF- $\alpha$  во всех исследуемых группах, однако в зарубежных работах при МС определено его повышение [22, 23].

Неожиданным оказалось снижение концентрации IFN- $\gamma$  во всех исследуемых группах пациентов, начиная с изолированного АО. Содержание указанного цитокина в периферической крови коррелировало с компонентами МС (ХсЛПНП, ХсЛПВП), медиатором жировой ткани лептином. Низкий уровень IFN- $\gamma$  может свидетельствовать об иммунодефицитном состоянии при АО и МС.

При ожирении и МС по данным литературы зафиксировано повышение хемокина МСР-1, что также показано и в нашей работе. Высокая концентрация МСР-1 в основном оказывает влияние на иммунные механизмы, однако доказана патогенетическая роль МСР-1 в развитии сердечно-сосудистых и эндокринных расстройств [24]. Участие МСР-1 в пато-

генезе воспаления при ожирении и метаболическом синдроме связано с повышением числа провоспалительных M1 макрофагов в жировой ткани. Во-первых, зрелые адипоциты секретируют MCP-1 и, таким образом, индуцируют хемотаксис макрофагов. Вторым механизмом является активация пролиферации резидентных макрофагов жировой ткани под действием MCP-1. Нами определена взаимосвязь MCP-1 с компонентами MC – уровнем глюкозы, триглицеридов, маркерами инсулинорезистентности Tg/ЛПВП и TuG, а также маркером дисфункции висцеральной жировой ткани VAI. В исследованиях других авторов установлена корреляция гипергликемии и высокого уровня MCP-1 [25, 26].

Во всех исследуемых группах нами выявлено снижение концентрации противовоспалительного цитокина IL-4. Снижение IL-4 при ожирении показано в работе зарубежных авторов [27]. У пациентов в группе АО+1 и MC IL-4 был взаимосвязан с компонентами MC – ХсЛПВП и наличием артериальной гипертензии. Также в группе MC определена ассоциация концентрации IL-4 с уровнем лептина, активностью фибринолитической системы. Данные литературы по уровню IL-4 при артериальной гипертензии неоднозначны [28, 29]. При MC в периферической крови выявлено повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-10, что может быть объяснено компенсаторной реакцией в условиях активации воспаления и высокого уровня провоспалительных цитокинов.

Нами установлено снижение уровня IL-2 во всех исследуемых группах пациентов относительно группы сравнения. В группе пациентов с MC уровень IL-2 имел отрицательную взаимосвязь с эулобулиновым фибринолизом, что может свидетельствовать об угнетении уровня IL-2 при поражении эндотелия. IL-2 является медиатором, который регулирует рост и дифференцировку различных субпопуляций Т-лимфоцитов. Снижение концентрации данного цитокина является одним из патогенетических механизмов аутоиммунного воспаления.

Выявленные особенности цитокинового спектра при АО и MC с одной стороны, отражают изменения числа иммунных клеток и их субпопуляций, а также нарушения их функциональной активности. Кроме того, наши результаты демонстрируют взаимосвязь гуморальных факторов иммунитета и компонентов MC, что также указывает на роль иммунной системы в прогрессии АО и формировании MC. Снижение уровня цитокинов IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$  может являться следствием дисфункции Т-клеточного звена и отражает нарушение иммунорегуляторной функции Т-лимфоцитов.

## Выводы

1. У лиц молодого возраста с изолированным АО зафиксирована активация коагуляционного гемостаза. Прогрессирование АО сочетается с угнетением активности фибринолитической системы. Выявлены изменения антикоагулянтного потенциала у лиц молодого возраста с АО и MC – снижение уровня TFPI при изолированном АО и повышение при MC.

2. Нарушения гуморального иммунитета у лиц молодого возраста фиксируются уже при изолированном АО и проявляются снижением уровня цитокинов IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$ . Описанные изменения характерны в том числе для лиц с комбинацией АО с одним из компонентов MC, а при MC сочетаются с повышением уровня IL-6, IL-10 и MCP-1.

## Литература

(п.п. 2; 4; 5; 9-11; 13; 14; 16; 17; 19-29 см. References)

1. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; 6; Прил. 2: 1-29.
3. Бородкина Д.А., Груздева О.В., Квиткова Л.В., Барбараш О.Л. Распределение жировых отложений: разгадка кажущегося парадокса ожирения в кардиологии? *Ожирение и метаболизм*. 2017; 14(2): 3-8. <https://doi.org/10.14341/omet201723-8>
6. Либис Р.А., Исаева Е.Н. Возможность применения индекса висцерального ожирения в диагностике метаболического синдрома и прогнозировании риска его осложнений. *Российский кардиологический журнал*. 2014; 9: 48–53. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-9-48-53>
7. Чумакова Г.А., Веселовская Н.Г., Гриценко О.В., Отт А.В. Метаболический синдром: сложные и нерешенные проблемы. *Российский кардиологический журнал*. 2014; 3: 63-71. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-3-63-71>
8. Сумеркина В.А., Телешева Л.Ф., Головнева Е.С. Особенности клеточного иммунитета при абдоминальном ожирении и метаболическом синдроме и их взаимосвязь с факторами кардиометаболического риска, дисфункцией висцеральной жировой ткани и профилем адипокинов. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2022; 19(3): 173-83. <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-3-173-183>
12. Романцова Т.И., Сыч Ю.П. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении. *Ожирение и метаболизм*. 2019; 16(4): 3–17. <https://doi.org/10.14341/omet12218>
15. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*. 1989; 10: 15-8.
18. Добровольский А.Б., Титаева Е.В., Яровая Е.Б., Сторожилова А.Н., Трубочева И.А., Серебрякова В.Н., Кавешников В.С., Панченко Е.П. Д-димер, фибриноген и уровень артериального давления. Анализ популяции взрослого населения Томска (исследование ЭССЕ-РФ). *Атеротромбоз*. 2014; 2: 19-24. <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2014-2-19-24>

References

1. Recommendations of experts of the All-Russian Scientific Society of Cardiology on the diagnosis and treatment of metabolic syndrome. The second revision. *Kardiovaskularnaya terapiya I profilaktika*. 2009; 6; Pril. 2: 1-29.
2. Reaven G.M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12): 1595-607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
4. Amato M.C., Giordano C., Galia M., Criscimanna A., Vitabile S., Massimo Midiri M., Galluzzo A. Visceral adiposity index a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*. 2010; 33(4): 920-2. <https://doi.org/10.2337/dc09-1825>
5. Vachharajani V., Granger D.N. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2009; 61(4): 424-30. <https://doi.org/10.1002/iub.169>
9. Li X., Weber N.C., Cohn D.M., Hollmann M.W., DeVries J.H., Hermanides J., Preckel B. Effects of hyperglycemia and diabetes mellitus on coagulation and hemostasis. *Journal of Clinical medicine*. 2021; 10: 2419. <https://doi.org/10.3390/jcm10112419>
10. Braune J., Weyer U., Hobusch C., Mauer J., Brüning J.C., Bechmann I., et al. IL-6 regulates M2 polarization and local proliferation of adipose tissue macrophages in obesity. *Journal of Immunology*. 2017; 198: 2937-4. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600476>
11. Kiran S., Kumar V., Murphy E.A., Enos R.T., Singh U.P. High fat diet-induced CD8+ T cells in adipose tissue mediate macrophages to sustain low-grade chronic inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 680944. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680944>
13. Zhuang Y., Zhang J., Li Y., Gu H., Zhao J., Sun Y., et al. B lymphocytes are predictors of insulin resistance in women with gestational diabetes mellitus. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets*. 2019; 19(3): 358-66. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190101130300>
14. Fu S., Yao Y., Lv F., Zhang F., Zhao Y., Luan F. Associations of immunological factors with metabolic syndrome and its characteristic elements in Chinese centenarians. *Journal of Translational Medicine*. 2018; 16: 315. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1691-4>
16. Calabresi L., Gomaschi M., Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2003; 23: 1724-31. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000094961.74697.54>
17. Maple-Brown L.J., Cunningham J., Nandi N., Hodge A., O’Dea K. Fibrinogen and associated risk factors in a high-risk population: urban indigenous Australians, the DRUID Study. *Cardiovascular Diabetology*. 2010; 9: 69. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-69>
19. Ay L., Kopp H-P., Brix J-M., Ay C., Quehenberger P., Scherthner G-H., Pabinger I., Scherthner G. Thrombin generation in morbid obesity: significant reduction after weight loss. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010; 8: 759-65. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03766.x>
20. Mihara M., Aihara K.-I., Ikeda Y., Yoshida S., Kinouchi M., Kurahashi K., et al. Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Endocrinology*. 2010; 151(2): 513-9. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0661>
21. Hubler M.J., Kennedy A.J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016; 34: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.11.002>
22. Marques P., Collado A., Martinez-Hervás S., Domingo E., Benito E., Piqueras L., et al. Systemic inflammation in metabolic syndrome: increased platelet and leukocyte activation, and key role of CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 axes in arterial platelet-proinflammatory monocyte adhesion. *Journal of Clinical Medicine*. 2019; 8(5): 708. <https://doi.org/10.3390/jcm8050708>
23. Monserrat-Mesquida M., Quetglas-Llabrés M., Capó X., Bouzas C., Mateos D., Pons A., et al. Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants*. 2020; 9: 236. <https://doi.org/10.3390/antiox9030236>
24. Hammarstedt A., Gogg S., Hedjazifar S., Nerstedt A., Smith U. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. *Physiology Review*. 2018; 98: 1911-41. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2017>
25. Liu N., Sheng J., Wang Y. Effect of stress hyperglycaemia on monocyte chemoattractant protein-1 levels and the short-term prognosis of patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019; 17: 3823-9. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7338>
26. Dommel S., Blüher. M. Does C-C motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) link obesity to a pro-inflammatory state? *International Journal of Molecular Science*. 2021; 22: 1500. <https://doi.org/10.3390/ijms22031500>
27. Lin S.-Y., Yang C.-P., Wang Y.-Y., Hsiao C.-W., Chen W.-Y., Liao S.-L., et al. Interleukin-4 improves metabolic abnormalities in leptin-deficient and high-fat diet mice. *International Journal of Molecular Science*. 2020; 21: 4451. <https://doi.org/10.3390/ijms21124451>
28. Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Johnson R.J. Role of the immune system in hypertension. *Physiology Review*. 2017; 97: 1127-64. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2016>
29. Kassem K.M., Ali M., Rhaleb N.-E. Interleukin 4: its role in hypertension, atherosclerosis, valvular, and nonvalvular cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular and Pharmacology Therapy*. 2020; 25(1): 7-14. <https://doi.org/10.1177/1074248419868699>

Сведения об авторах:

**Сумеркина Вероника Андреевна**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ, Южно-Уральский государственный медицинский университет;

**Головнева Елена Станиславовна**, доктор мед. наук, проф., каф. нормальной физиологии им. акад. Ю.М. Захарова, Южно-Уральский государственный медицинский университет;

**Телешева Лариса Федоровна**, доктор мед. наук, проф., каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Южно-Уральский государственный медицинский университет.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-008.9:615.874.25:616-092.9

**Митюкова Т.А., Кузнецова Т.Е., Басалай А.А., Чудиловская Е.Н., Полулях О.Е., Щербаков Я.В., Хрусталёва Т.А.**

## **Морфологические и функциональные характеристики щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и его коррекции у крыс самцов Вистар**

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

**Введение.** Ожирение вызывает целый ряд эндокринных и метаболических расстройств. Однако вопросы немедикаментозной коррекции ожирения и дисфункции щитовидной железы пока изучены недостаточно.

**Цель работы** – изучение морфо-функционального состояния щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и вариантах его немедикаментозной коррекции у крыс самцов Вистар.

**Методика.** Эксперименты выполнялись на крысах самцах Вистар и включали 6 групп животных: 1) Группа контроля, получавшая стандартную диету в течение 16 недель («СтД»), 2) Высококалорийная диета в течение 16 недель («ВКД»), 3) ВКД с переходом на стандартную диету «ВКД/СтД» – 8/8 недель, 4) СтД с подключением бега «СтД + бег» – 16/8 недель, 5) ВКД с подключением бега «ВКД + бег» – 16/8 недель и 6) «ВКД/СтД + бег» – 8/8+8 недель. У всех экспериментальных животных оценивали массу тела, висцерального жира, морфологические характеристики ткани щитовидной железы (ЩЖ), активность тиропероксидазы (ТПО), содержание триглицеридов (ТГ) и интерлейкина 6 (ИЛ-6) в ткани ЩЖ, а также уровни тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) в сыворотке крови.

**Результаты.** Высококалорийная диета приводила к висцеральному ожирению и нарушениям гистоструктуры ЩЖ, характерным для гиподисфункции. В сыворотке крови регистрировалось нарастание уровня тироксина, но при этом развивалась тенденция к снижению активности ТПО с одновременным повышением содержания триглицеридов и снижением ИЛ-6 в ткани ЩЖ. При переходе от ВКД к СтД достигалась успешная коррекция ожирения и нормализация функции ЩЖ. Наиболее полное восстановление активности ТПО и других метаболических процессов в ткани ЩЖ отмечалось при сочетанной коррекции ожирения с подключением бега на тредмиле.

**Заключение.** Висцеральное диет-индуцированное ожирение сопровождается повышением уровня тироксина в крови, однако, при этом развиваются морфологические и биохимические признаки снижения метаболических процессов в ткани ЩЖ. Успешная коррекция висцерального ожирения включает восстановление структуры и функции ЩЖ.

**Ключевые слова:** ожирение; щитовидная железа; немедикаментозная коррекция ожирения; бег на тредмиле

**Для цитирования:** Митюкова Т.А., Кузнецова Т.Е., Басалай А.А., Чудиловская Е.Н., Полулях О.Е., Щербаков Я.В., Хрусталёва Т.А. Морфологические и функциональные характеристики щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и его коррекции у крыс самцов Вистар. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 47-55.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.47-55

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Митюкова Т.А., Хрусталёва Т.А.; сбор и обработка материала – Кузнецова Т.Е., Басалай А.А., Чудиловская Е.Н., Полулях О.Е., Щербаков Я.В.; подготовка иллюстративного материала – Кузнецова Т.Е., Чудиловская Е.Н.; статистическая обработка результатов – Чудиловская Е.Н., Щербаков Я.В.; написание текста – Митюкова Т.А., Кузнецова Т.Е., Басалай А.А.; редактирование – Хрусталёва Т.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Митюкова Татьяна Алексеевна, e-mail: mityukovat@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований Национальной академии наук Беларуси # 4.1.1.5.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.01.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Mityukova T.A., Kuznetsova T.E., Basalai A.A., Chudilovskaya E.N., Poluliakh O.Y., Shcherbakov Ya.V., Khrustaleva T.A.  
**Morphological and functional characteristics of the thyroid gland in diet-induced obesity and its correction in male Wistar rats**

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Akademicheskaya St. 28, Minsk 220072, Republic of Belarus

**Background.** Obesity causes numerous endocrine and metabolic disorders. However, the issues of drug-free correction of obesity and thyroid dysfunction are insufficiently studied.

**The aim** was to study the morpho-functional state of the thyroid gland in diet-induced obesity and possibilities of its drug-free correction in male Wistar rats.

**Methods.** The experiments were performed in six groups of male Wistar rats: 1) Standard diet (StD) for 16 wks (Control group); 2) High-calorie diet (HCD) for 16 wks (HCD group); 3) HCD for 8 wks with switching to StD (HCD/StD group) for 8 wks; 4) StD for 16 wks with treadmill running during the last 8 wks (StD+running group); 5) HCD for 16 wks with running during the last 8 wks (HCD+running group); 6) HCD for 8 wks followed by StD for 8 wks with running during the last 8 wks (HCD/StD+running group). Body weight, visceral fat, morphological characteristics of thyroid tissue (TG), thyroperoxidase (TPO) activity, triglyceride (TG) and interleukin 6 (IL-6) content in TG tissue, and serum levels of thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) were assessed.

**Results.** HCD resulted in visceral obesity and thyroid histostructural abnormalities typical of hypofunction. Blood serum T4 increased, but, at the same time, TPO activity tended to decrease along with an increase in thyroid TG and a decrease in thyroid IL-6. After transition from HCD to StD, successful correction of obesity and normalization of thyroid function were achieved. The most complete recovery of TPO activity and other metabolic processes in the thyroid tissue was noted in the combined correction of obesity with treadmill running.

**Conclusion.** Visceral diet-induced obesity is accompanied by an increase in blood T4. However, morphological and biochemical signs of reduced metabolic processes in thyroid tissue develop. Successful correction of visceral obesity restores thyroid structure and function.

**Keywords:** obesity; thyroid; drug-free correction of obesity; treadmill running

**For citation:** Mityukova T.A., Kuznetsova T.E., Basalai A.A., Chudilovskaya E.N., Poluliakh O.Y., Shcherbakov Ya.V., Khrustaleva T.A. Morphological and functional characteristics of the thyroid gland in diet-induced obesity and its correction in male Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 47-55. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.47-55

**Author's contribution:** study concept and design – Mityukova T.A., Khrustaleva T.A.; material collection and processing – Kuznetsova T.E., Basalai A.A., Chudilovskaya E.N., Poluliakh O.Y., Shcherbakov Ya.V.; preparation of illustrative materials – Kuznetsova T.E., Chudilovskaya E.N.; statistical processing – Chudilovskaya E.N., Shcherbakov Ya.V.; writing text – Mityukova T.A., Kuznetsova T.E., Basalai A.A.; editing – Khrustaleva T.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** Tatyana A. Mityukova, Ph. D. in Biology, Chief Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, 28 Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus, e-mail: mityukovat@gmail.com

**Financing.** The study was supported by the State Program for Scientific Research of the National Academy of Sciences of Belarus # 4.1.1.5.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflicts of interest.

Received 09.01.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Хорошо известно, что тиреоидные гормоны участвуют в регуляции основного обмена, термогенеза и обмена липидов в организме [1]. В клинических и эпидемиологических исследованиях отмечается, что снижение функции щитовидной железы может быть связано с избыточной массой тела и ожирением, и, в свою очередь, приводит к нарушениям липидного обмена, которые проявляются в виде неблагоприятных атерогенных сдвигов липидного спектра крови, эндотелиальной дисфункции и атеросклероза кровеносных сосудов [2]. Некоторые авторы высказыва-

ют предположение, что дефицит тиреоидных гормонов влияет на развитие инсулинорезистентности при избыточном питании [3]. В настоящее время формируются представления о том, что тиреоидный статус играет важную роль, не только в патогенезе ожирения, но и в системе адаптивных регуляторных процессов, обеспечивающих перестройку метаболизма при избыточном высококалорийном питании и различных экстремальных воздействиях [1, 4-7]. Недостаточно изучены вопросы связи дисфункции щитовидной железы с липотоксичностью, а также влиянии физических на-

грузок на состояние тиреоидного статуса при ожирении. Разработка этих вопросов может иметь практическое значение, с точки зрения коррекции патологических последствий избыточной массы тела и ожирения.

**Цель работы** – изучение морфо-функционального состояния щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и вариантах его немедикаментозной коррекции у крыс самцов Вистар.

### Методика

Экспериментальная работа проведена на половозрелых крысах самцах Вистар с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123). Исследование выполнено в соответствии с рекомендациями комиссии по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 22 января 2021 г.).

Эксперимент состоял из 2 этапов и включал 80 животных (**рис. 1**).

На первом этапе (8 нед) группа контроля получала стандартную диету (СтД), а экспериментальная группа – высококалорийную диету (ВКД). На втором этапе (следующие 8 нед) контрольная группа была разделена на 2 подгруппы («СтД» и «СтД + бег») и крысы второй подгруппы начали тренироваться на тредмиле. Группа «ВКД» была разделена на две части – первая осталась на ВКД («ВКД»), а вторая перешла на стандартную диету («ВКД/СтД»). Каждая часть была разделена еще на 2 подгруппы таким образом, чтобы половина крыс тренировалась на тредмиле («ВКД + бег», «ВКД/СтД + бег»).

Модель высококалорийной диеты включала стандартный рацион вивария с добавлением жиров животного происхождения (свиное сало, 45% от суточной ка-

лорийности пищи) и углеводов (питьевая вода заменялась на 10 % раствор фруктозы со свободным доступом к поилкам) [8]. Умеренная физическая нагрузка осуществлялась в виде бега на тредмиле в течение 20 мин со скоростью 15 м/мин утром с 9:00 до 12:00 ч, натошак, 5 дней в неделю [9]. Общая продолжительность физических нагрузок составила 8 нед.

Еженедельно контролировали массу тела животных на весах SATURN (Китай). Выведение из эксперимента осуществляли под тиопенталовым наркозом. Оценивали массу висцерального жира, отбирали биологический материал (щитовидная железа, сыворотка крови) для последующей работы. Все биологические образцы хранили в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 3 мес.

**Морфологические исследования.** Фрагменты ткани щитовидной железы подвергали быстрой заморозке в криостате. Серийные срезы толщиной 7 мкм для гистологического исследования изготавливали на микротоме-криостате HM 525 («Microm», Германия) непосредственно после заморозки экспериментального материала. Криостатные срезы подсушивали на воздухе в течение 2 – 5 мин, затем фиксировали в охлажденном 96<sup>o</sup> спирте. Срезы для обзорной характеристики структуры окрашивались по общепринятой методике гематоксилин-эозином. Исследование микропрепаратов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа Альтами LUM-1 (Альтами, Россия), оснащенного цифровой фотокамерой 1300D EOS Body (Canon, Япония).

**Биохимические и гормональные исследования.** В ткани щитовидной железы определяли содержание общего белка, триглицеридов (ТГ) ферментативным методом на автоматическом биохимическом анализаторе BS-200 (Mindray, Китай) с использованием коммер-



**Рис. 1.** Дизайн эксперимента.

**Fig. 1.** Experiment design.

ческих наборов фирмы «Диасенс» (Республика Беларусь), активность тиреопероксидазы (ТПО) оценивали спектрофотометрическим методом как описано в работе [10], уровень ИЛ-6 – с использованием набора RAT IL-6 ELISA («BD Biosciences», США). Содержание тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов «ХЕМА» (Россия).

Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0. Для проверки нормальности распределения полученных данных был применен критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения использовали параметрическую статистику, данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартной ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ). Статистическую значимость различий рассчитывали по t-критерию Стьюдента. При ненормальном распределении использовали непараметрическую статистику, данные представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей ( $Me [25; 75]$ ). Значимость различий оценивали по U-критерию Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Содержание животных на высококалорийной диете (ВКД) выявило тенденцию к нарастанию массы тела. По окончании эксперимента было обнаружено, что переход от ВКД к стандартной диете в сочетании с бегом на тредмиле приводил к значимому снижению массы тела (на 13,1 %) по сравнению с группой «ВКД». У крыс из групп «СтД» и «СтД + бег» масса висцерального жира была практически одинаковой ( $7,99 \pm 0,73$  и  $6,68 \pm 0,77$  г соответственно). У животных из групп «ВКД» и «ВКД + бег» отмечалось, примерно, трехкратное статистически значимое нарастание массы висцерального жира ( $22,99 \pm 3,20$  и  $24,27 \pm 2,75$  г соответственно) по сравнению с крысами, содержащимися на стандартной диете вивария, что свидетельствует о развитии висцерального ожирения на фоне ВКД. При коррекции ожирения с переходом на стандартную диету, независимо от физических нагрузок, масса висцеральной жировой ткани существенно снижалась, достигая уровня контрольных значений.

При исследовании препаратов щитовидной железы (ЩЖ) контрольной группы животных, получавших стандартную диету («СтД»), гистологическая картина щитовидной железы соответствовала физиологической норме (рис. 2, а, б).

У животных, получавших высококалорийную диету («ВКД»), дольчатое строение железы сохранялось.

Выявлялось увеличение размеров фолликулов с накоплением в них коллоида (рис. 2, в). Стенки фолликулов были истончены. Тироциты имели плоскую форму, их ядра выглядели пикнотичными, вокруг ядер наблюдался тонкий ободок цитоплазмы. Количество интерфолликулярных островков было незначительно. Вышеописанные признаки характеризуют снижение функциональной активности тироцитов. При этом наблюдалась умеренная диффузная лейкоцитарная инфильтрация. Вблизи сосудов часто визуализировались крупные липидные включения (рис. 2, г), т. е. после 16 нед высококалорийной диеты были выявлены изменения структурных компонентов щитовидной железы крыс, соответствующие гиподисфункции органа.

Через 8 нед после перехода с 8-недельной высококалорийной диеты на стандартный рацион (группа «ВКД/СтД») отмечалось практически полное восстановление гистоархитектоники щитовидной железы. Лишь единичные фолликулы признаки гиподисфункции.

У крыс, получавших стандартный рацион питания и бегавших на тредмиле в течение 8 нед («СтД + бег»), общая архитектура органа сохранялась на уровне контроля

После 16-недельного содержания крыс на высококалорийной диете и 8-недельного бега на тредмиле («ВКД + бег») дольчатое строение железы сохранялось, но архитектура органа была близка к таковой у крыс группы «ВКД». В целом картина гистоструктуры щитовидной железы соответствовала гиподисфункции органа. Наряду с этим регистрировалось значительное число липидных включений

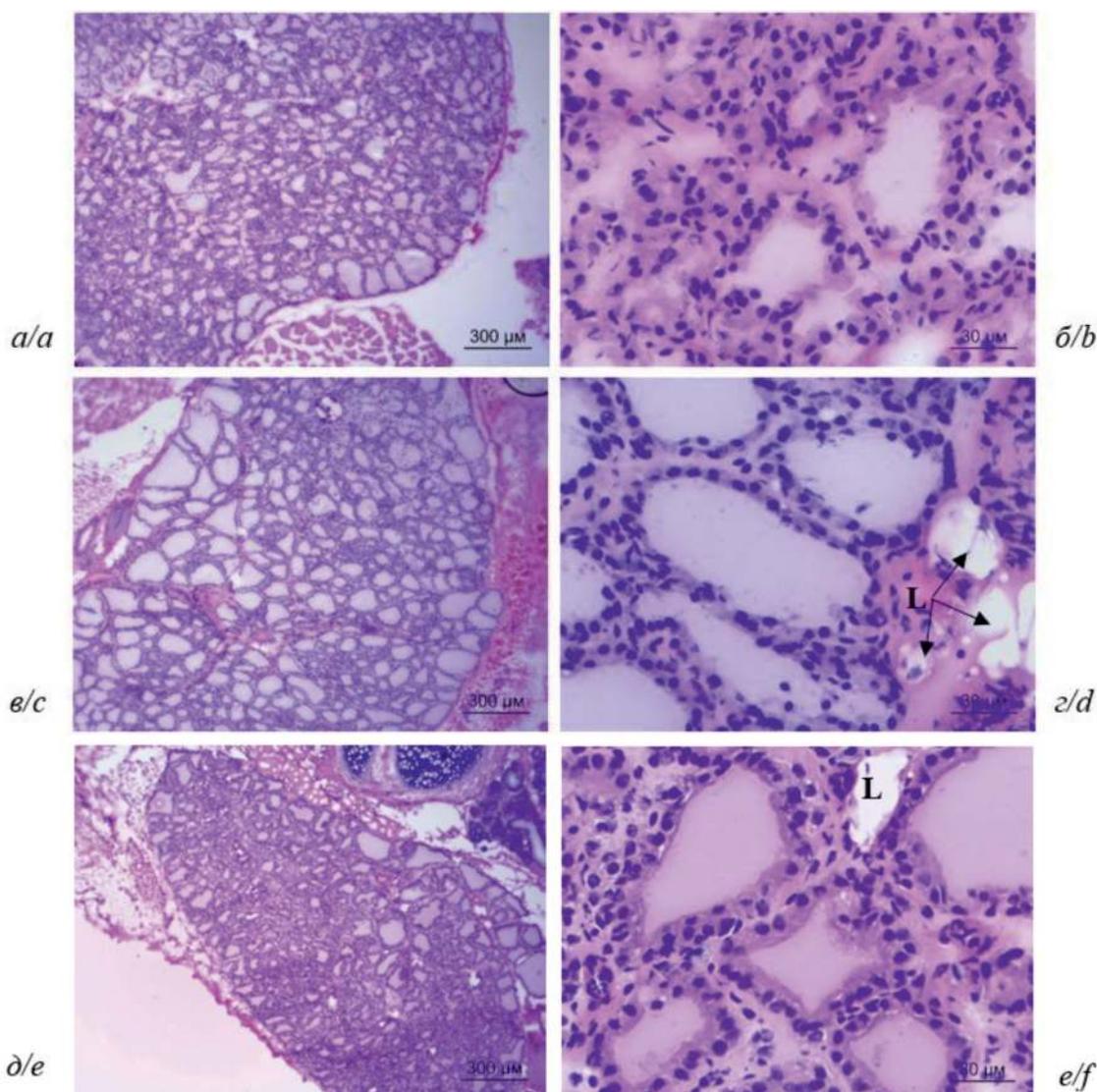
У крыс, после высококалорийной диеты перешедших на стандартный рацион питания и бегавших на тредмиле в течение 8 недель («ВКД/СтД + бег»), общая архитектура органа была близка к норме. Однако нормализация была неполной, поскольку встречались единичные растянутые фолликулы с уплощенным эпителием в состоянии гиподисфункции. Местами выявлялись крупные липидные капли (рис. 2, е).

Определение уровня тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) в сыворотке крови животных выявило статистически значимое повышение Т4 при высококалорийной диете на 32,4 % по сравнению с контролем и нормализацию показателя в группе животных, которые перешли на сбалансированную диету. Умеренная физическая нагрузка в виде бега на тредмиле не влияла на содержание Т4 и Т3 в крови животных, получавших сбалансированную диету. У крыс, получавших высококалорийное питание в сочетании с физическими нагрузками, отмечалось повышенное содержание Т4 в сыворотке крови на 26,7% по сравнению с контролем,

сопоставимое с таковым в группе «ВКД». При переходе на стандартную диету в сочетании с бегом содержание Т4 в крови животных возвращалось к норме. Интересно, что при сочетанной коррекции ожирения («ВКД/СтД + бег») отмечалось значимое снижение уровня Т3 в сыворотке крови (на 30,7%) по отношению к животным группы «СтД (Контроль)» (табл.).

Активность тиреопероксидазы (ТПО) в ЩЖ крыс, находившихся на ВКД, демонстрировала тенденцию

к снижению по сравнению с контролем и была статистически значимо снижена (на 21,4%) по сравнению с группой крыс, которые перешли от ВКД к стандартной диете. Коррекция ожирения путем перехода к сбалансированному питанию приводила к нормализации активности ТПО в ЩЖ крыс. Умеренные физические нагрузки не влияли на активность фермента при стандартной диете. Бег на тредмиле на фоне ВКД не приводил к нормализации сниженной активности



**Рис. 2.** Гистоструктура щитовидной железы крыс экспериментальных групп без физических упражнений: а, б – «СтД»; в, г – «ВКД»; и групп с физическими упражнениями: д, е – «ВКД/СтД + бег». Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. 40 (а, в, д), ×400 (б, г, е). Окраска: гематоксилин-эозин. L – липидные включения.

**Fig. 2.** Histostructure of the thyroid gland of rats from the experimental groups without exercise: a, b – «StD»; c, d – «HCD»; e, f – group with exercise «HCD/StD + running». Color: hematoxylin-eosin. Magnification 40 (a, c, e), ×400 (b, d, f). L – lipid inclusions.

**Обсуждение**

ТПО. Наиболее существенное повышение активности фермента (в пределах контрольных величин) отмечалась у крыс в группе сочетанной коррекции ожирения «ВКД/СтД + бег» – увеличение активности ТПО на 45,5 % по отношению к группе «ВКД» и на 60,0 % по отношению к группе «ВКД + бег» (табл.).

Содержание триглицеридов в ткани щитовидной железы у крыс группы «ВКД» было повышено в 1,7 раза по сравнению с группой контроля. При физических нагрузках и потреблении высококалорийной пищи также выявлено статистически значимое повышение концентрации триглицеридов в ткани ЩЖ (в 2,2 раза) в сравнении с контрольными животными. Переход на стандартную диету независимо от физических нагрузок нормализовал содержание триглицеридов в железе (табл.).

Содержание ИЛ-6 в ткани ЩЖ при ВКД снижалось почти в 2 раза по сравнению с контролем и приближалось к норме при переходе на стандартную диету и при ВКД в сочетании с бегом. Наиболее полное восстановление уровня ИЛ-6 отмечалось в группе сочетанной коррекции («ВКД/СтД + бег») (табл.).

После 16 нед высококалорийной диеты в щитовидной железе выявлены изменения структурных компонентов характерные для снижения функции органа. Аналогичные изменения при ожирении у половозрелых белых крыс были показаны и другими авторами [11]. Полученные нами результаты нашли свое подтверждение в целом ряде работ, изучавших состояние ЩЖ у крыс на фоне высококалорийной диеты, причем, как у самцов [12], так и у самок [13]. Как свидетельствуют данные S. Shao и соавт. [12] в щитовидной железе самцов крыс группы высококалорийного питания обнаруживаются признаки очагового коллоидного зоба – размер фолликулов увеличен, внутреннее пространство фолликулов расширено от накопления коллоида, тиреоциты уплощены. В опытах на мышах были обнаружены сходные гистоморфологические изменения. Более того, в работе было показано, что высококалорийная диета усугубляет неблагоприятное воздействие избытка йода на щитовидную железу [14].

**Уровни гормонов тиреоидного статуса в сыворотке крови и биохимические показатели в ткани щитовидной железы у крыс экспериментальных групп (Me [25; 75])**

**Levels of thyroid status hormones in blood serum and biochemical parameters in thyroid tissue in rats of experimental groups (Me [25; 75])**

Показатели Indices	Группы животных Animal groups					
	СтД StD	ВКД HCD	ВКД/СтД HCD/StD	СтД+бег StD+running	ВКД+бег HCD+running	ВКД/СтД+бег HCD/StD+running
Сыворотка крови Blood serum						
Т3, нмоль/л T3, nmol/l	2,67 [1,97; 2,85]	2,36 [2,07; 2,67]	2,14 [1,49; 2,96]	2,34 [1,83; 2,84]	2,47 [1,85; 2,96]	1,85* [1,72; 2,10]
Т4, нмоль/л T4, nmol/l	50,24 [47,00; 53,87]	66,51*#^ [55,12; 85,43]	44,70 [41,79; 61,9]	47,86 [39,40; 56,50]	63,66*#^ [56,50; 75,53]	49,86•& [42,84; 56,79]
Ткань щитовидной железы Thyroid tissue						
ТПО, МЕ/г белка*мин TPO, IU/g protein*min	0,28 [0,16; 0,88]	0,22^ [0,12; 0,27]	0,28 [0,25; 0,29]	0,27 [0,23; 0,61]	0,20#^ [0,14; 0,22]	0,32•& [0,22; 0,36]
ТГ, мкмоль/г белка TG, μmol/g protein	59,13 [52,12; 93,83]	100,11*#^ [84,23; 159,07]	65,96 [59,88; 81,46]	78,22 [65,71; 82,78]	127,55*#^ [101,45; 145,76]	72,72•& [59,88; 81,46]
ИЛ-6, пг/г белка IL-6, pg/g protein	416,81 [359,17; 476,51]	228,43*#^ [134,80; 381,18]	367,08 [336,02; 540,60]	445,57 [326,27; 599,61]	327,52 [185,66; 378,51]	460,34• [282,54; 589,12]

**Примечание.** Статистически значимые отличия при  $p \leq 0,05$  (U-критерий Манна–Уитни): \* – от группы «СтД (Контроль)», • – от группы «ВКД», ^ – от группы «ВКД/СтД», # – от группы «СтД + бег», & – от группы «ВКД + бег».

**Note.** Significant differences at  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney U-criterion): \* – from the «StD (Control)» group, • – from the «HCD» group, ^ – from the «HCD/StD» group, # – from the «StD + running» group, & – from the «HCD + running» group.

Выявленное нами нарастание концентрации общего Т4 в сыворотке крови животных, потреблявших высококалорийную диету предположительно, носит адаптивный характер, направленный на активацию основного обмена при повышенной калорийности питания. Лептин, вырабатываемый адипоцитами, активирует ось гипоталамус-гипофиз-ЩЖ и, соответственно, вызывает выброс тиреоидных гормонов в кровь [15]. Однако, согласно имеющимся на сегодняшний день данным, одним из неблагоприятных последствий ожирения является риск развития гипотиреоза, при котором функция щитовидной железы постепенно снижается, приводя к уменьшению содержания тироксина в крови, тем самым оказывая негативное влияние на основной обмен, усугубляя состояние ожирения [16, 17]. В нашей работе у крыс групп «ВКД» и «ВКД + бег» наблюдался повышенный выброс Т4 в кровь, однако, одновременно развивалась тенденция к снижению активности ТПО в ткани ЩЖ. Наиболее значимое снижение активности фермента отмечалось в группе «ВКД + бег», что существенно отличалось от группы «СтД + бег». Эти факты указывают на высокую вероятность развития гипотиреоза в перспективе при длительном избыточном питании. Причем, умеренные физические нагрузки не предотвращали негативное воздействие ВКД на активность ТПО. В литературе есть данные о том, что в ЩЖ крыс, получавших свиное сало, наблюдалось повышение содержания триглицеридов и существенное снижение уровня белков связанных с синтезом тиреоидных гормонов – TTF-1 (тиреоидный фактор транскрипции) и NIS (sodium/iodide symporter – транспортер ионов Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>) [12]. Полученные нами данные согласуются с этими сведениями и подтверждают, что липотоксичность может рассматриваться, как возможная причина нарушения синтеза тиреоидных гормонов.

В когортном исследовании, проведенном в Китае и охватившем 16 975 человек, была выявлена положительная корреляция между индексом массы тела (ИМТ) и снижением уровня свободного Т4, при этом сообщалось, что уровни свободного Т3 в сыворотке крови были повышены, либо не изменились и даже снизились [18]. Аналогичные данные преобладают в большинстве источников литературы отражающих влияние ожирения на тиреоидный статус у людей [15-17].

Что касается влияния физических нагрузок на функцию ЩЖ, то сведения неоднозначны. В популяционном когортном исследовании, охватившем 2470 участников, выполненном в период 2006-2013 гг. в Амстердаме, авторы не выявили связи меж-

ду уровнем эндогенных гормонов щитовидной железы и общей физической активностью [19]. Однако, у пациентов, получавших заместительную терапию по поводу гипотиреоза, было показано стимулирующее влияние регулярных физических упражнений на функцию ЩЖ, что облегчало состояние гипотиреоза и позволяло уменьшать поддерживающие дозы L-тироксина [20]. В опытах на крысах самцах Вистар было зарегистрировано, что принудительное плавание по 30 мин в день в течение 8 нед улучшает функцию щитовидной железы, способность к обучению и пространственную память, причем, как у здоровых животных, так и у крыс с индуцированным гипотиреозом [21]. При оценке эффекта острой физической нагрузки у крыс самцов Вистар было обнаружено значительное повышение уровня Т3 в сыворотке крови сразу после тренировки с постепенным снижением через 120 мин до значений более низких, чем в контрольной группе. Уровень Т4 постепенно повышался, достигая значений, значительно превышающих таковые в контрольной группе через 120 мин. В результате соотношение Т3/Т4 было значительно снижено через 60 и 120 мин после тренировки, что указывает на нарушение преобразования Т4 в Т3. Никаких изменений в уровне тиреотропина в сыворотке крови обнаружено не было [22]. Вышеприведенные экспериментальные данные свидетельствуют о быстро протекающих сдвигах в показателях тиреоидного статуса при выполнении физических упражнений высокой и средней интенсивности. В наших исследованиях было зарегистрировано статистически значимое снижение уровня Т3 в сыворотке крови только в группе сочетанной коррекции «ВКД/СтД + бег» по сравнению с контролем. Что касается уровня Т4, то он повышался при ВКД и возвращался к норме при переходе к стандартной диете независимо от физических нагрузок. Таким образом, в наших экспериментах не было выявлено существенного влияния умеренных физических нагрузок на уровень тиреоидных гормонов в сыворотке крови через сутки после окончания тренировочного периода.

Участие ИЛ-6 в функционировании ЩЖ необходимо рассматривать в контексте современных исследований, которые демонстрируют его многогранную плейотропную роль [23]. Показано, что ИЛ-6 представляет собой многофункциональную молекулу, которая обладает как провоспалительным, так и противовоспалительным действием, а также играет важную роль в регуляции энергетических процессов, усиливая липолиз, транспорт жирных кислот и глюкозы в клетки [23]. Наши данные выявили снижение уровня ИЛ-6 в ткани ЩЖ при ВКД, что, вероятно, указывает на

отсутствие выраженного воспалительного процесса в этой ткани. Из литературы известно, что ИЛ-6 в норме активирует внутриклеточные пути передачи сигналов (включая фосфатидилинозитол-3-киназу, АМР-активируемую протеинкиназу и Янус-киназу), которые необходимы для регуляции внутриклеточного метаболизма [23]. Таким образом, уменьшение уровня ИЛ-6 в ткани ЩЖ может косвенно отражать снижение активности метаболических и энергетических процессов в ЩЖ при ожирении и восстановление таковых при переходе к сбалансированному питанию, при беге на фоне ВКД и, особенно, при сочетанном воздействии – «ВКД/СтД + бег». Интересно, что нормализация уровня ИЛ-6 в ЩЖ наблюдалась при физической нагрузке даже на фоне продолжающейся высококалорийной диеты, что, предположительно, может свидетельствовать об активации энергетического обмена.

Подводя итоги, следует отметить, что диет-индуцированное висцеральное ожирение у крыс сопровождается изменениями морфологической структуры ЩЖ характерными для гипофункции и сочетается со снижением активности ТПО – фермента, ответственного за начальный этап синтеза тиреоидных гормонов. При успешной коррекции ожирения наблюдается нормализация основных морфологических и биохимических показателей в ткани ЩЖ.

### Выводы:

1. Высококалорийное питание крыс в течение 16 недель приводило к висцеральному ожирению и изменениям гистоструктуры щитовидной железы, характеризующимся снижением функции органа. Визуализировались крупные липидные включения и признаки лейкоцитарной инфильтрации.

2. Высококалорийная диета вызывала достоверное повышение содержания тироксина в сыворотке крови. Одновременно в ткани щитовидной железы развивалась тенденция к снижению активности тиреопероксидазы, что сопровождалось накоплением триглицеридов и снижением содержания ИЛ-6.

3. Переход на стандартную диету в течение последних 8 нед эксперимента приводил к успешной коррекции висцерального ожирения, способствовал нормализации гистоструктуры и метаболических показателей щитовидной железы, включая активность тиреопероксидазы, содержание триглицеридов и ИЛ-6, а также нормализовал уровень тироксина в крови.

4. Оптимальное восстановление метаболических процессов в ткани щитовидной железы достигалось при сочетанной коррекции ожирения, включавшей пе-

реход на сбалансированную диету в комплексе с умеренными физическими нагрузками в течение последних 8 недель эксперимента.

### Литература

(п.п. 1–3; 5–9; 11–23 см. References)

4. Надольник Л.И. Стресс и щитовидная железа. *Биомедицинская химия*. 2010; 56(4): 443-56. <https://doi.org/10.18097/pbmc20105604443>
10. Митюкова Т.А., Чудилова Е.Н., Мигалевич А.С. Определение активности тиреопероксидазы в ткани щитовидной железы (экспериментальное исследование). *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2020; 9(3): 285-9. <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.3.009>

### References

1. Biondi B. Thyroid and obesity: an intriguing relationship. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(8): 3614-7. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1245>
2. Duntas L.H. Thyroid disease and lipids. *Thyroid*. 2002; 12(4): 287-3. <https://doi.org/10.1089/10507250252949405>
3. Michalaki M.A., Vagenakis A.G., Leonardou A.S., Argentou M.N., Habeos I.G., Makri M.G., et al. Thyroid function in humans with morbid obesity. *Thyroid*. 2006; 16(1): 73-8. <https://doi.org/10.1089/thy.2006.16.73>
4. Nadolnik L.I. Stress and thyroid. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2010; 56(4): 443-56. (in Russian) <https://doi.org/10.18097/pbmc20105604443>
5. Sanchez V.C., Goldstein J., Stuart R.C., Hovanessian V., Huo L., Munzberg H., et al. Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone. *J Clin Invest*. 2004; 114(3): 357-69. <https://doi.org/10.1172/JCI21620>
6. Perello M., Cakir I., Cyr N.E., Romero A., Stuart R. C., Chiappini F., et al. Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299(6): 976-89. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00448.2010>
7. Fekete C., Lechan R.M. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev*. 2014; 35(2): 159-94. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1087>
8. Gancheva S., Savova M., Galunska B.T., Chervenkon T.G. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scientifica Medica*. 2015; 47(2): 14-21. <https://doi.org/10.14748/ssm.v47i2.1145>
9. Wang R., Tian H., Guo D., Tian Q., Yao T., Kong X. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci*. 2020; 9(3): 211-27. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.09.008>
10. Mityukova T.A., Chudilovskaya K.N., Mihalevich A.S. Determination of thyroperoxidase activity in thyroid tissue (experimental study). *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*. 2020; 9(3): 285-93. (in Russian) <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.3.009>
11. Karawya F.S., Zahran N.M., Azzam E. Is water fluoridation a hidden cause of obesity? Histological study on thyroid follicular cells of albino rats. *Egypt J Histol*. 2015; 38(3): 547-57. <https://doi.org/10.1097/01.EHX.0000470830.83093.88>
12. Shao S., Zhao Y., Song Y., Xu C., Yang J., Xuan S., et al. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2014; 35(11): 1411-20. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.82>

13. El-Sayed S.M., Ibrahim H.M. Effect of high-fat diet-induced obesity on thyroid gland structure in female rats and the possible ameliorating effect of metformin therapy. *Folia Morphol.* 2020; 79(3): 476-88. <https://doi.org/10.5603/FM.a2019.0100>
14. Han H., Xin P., Zhao L., Xu J., Xia Y., Yang X., et al. Excess iodine and high-fat diet combination modulates lipid profile, thyroid hormone, and hepatic LDLr expression values in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 147(1-3): 233-9. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9300-x>
15. Santini F., Marrullo P., Rotondi M., Ceccarini G., Pagano L., Ippolito S., et al. The crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease. *Eur J Endocrinol.* 2014; 171(4): 137-52. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0067>
16. Asvold B.O., Vatten L.J., Nilsen T.I., Bjørø T. The association between TSH within the reference range and serum lipid concentrations in a population-based study. The HUNT Study. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156(2): 181-6. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02333>
17. Alevizaki M., Saltiki K., Voidonikola P., Mantzou E., Papanicolaou C., Stamatelopoulos K. Free thyroxine is an independent predictor of subcutaneous fat in euthyroid individuals. *Eur J Endocrinol.* 2009; 161(3): 459-65. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0441>
18. Xu R., Huang F., Zhang S., Lv Y., Liu Q. Thyroid function, body mass index, and metabolic risk markers in euthyroid adults: a cohort study. *BMC Endocr Disord.* 2019; 19(1): 58. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0383-2>
19. Roa Dueñas O.H., Koolhaas C., Voortman T., Franco O.H., Ikram M.A., Peeters R.P., et al. Thyroid function and physical activity: A population-based cohort study. *Thyroid.* 2021; 31(6): 870-5. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0517>
20. Bansal A., Kaushik A., Singh C.M., Sharma V., Singh H. The effect of regular physical exercise on the thyroid function of treated hypothyroid patients: An interventional study at a tertiary care center in Bastar region of India. *Arch Med Health Sci.* 2015; 3(2): 244-6. <https://doi.org/10.4103/2321-4848.171913>
21. Noor Z., Agustini D., Soesatyo M. H.N.E., Soejono S.K. The effect of swimming exercise on thyroid function, spatial memory and anxiety in normal and propylthiouracil-induced hypothyroidism in Wistar rats. *Physiology and Pharmacology.* 2021; 25: 231-41. <http://dx.doi.org/10.52547/ppj.25.3.231>
22. Fortunato R.S., Ignácio D.L., Padron A.S., Peçanha R., Marassi M.P., Rosenthal D., et al. The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *J Endocrinol.* 2008; 198(2): 347-53. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0174>
23. Kistner T.M., Pedersen B.K., Lieberman D.E. Interleukin 6 as an energy allocator in muscle tissue. *Nat Metab.* 2022; 4(2): 170-9. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00538-4>

**Сведения об авторах:**

**Митюкова Татьяна Алексеевна**, канд. биол. наук, гл. науч. сотр., e-mail: mityukovat@gmail.com;

**Кузнецова Татьяна Евгеньевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., e-mail: tania\_k@mail.ru;

**Басалай Анастасия Александровна**, науч. сотр., e-mail: anastasiya.basalay@gmail.com;

**Чудиловская Екатерина Николаевна**, науч. сотр., e-mail: e.chudilovskaya@gmail.com;

**Полулях Ольга Евгеньевна**, науч. сотр., e-mail: oilipol@yandex.ru;

**Щербаков Яков Валентинович**, мл. науч. сотр., e-mail: yakov.shcherbakov.98@gmail.com;

**Хрусталёва Татьяна Александровна**, канд. биол. наук, ученый секретарь, e-mail: tanissia.lir@gmail.com

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9: 616.9-092.9

**Остапенко О.В., Макалиш Т.П., Оберемок В.В., Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Юрченко К.А., Челкак Е.В., Галышевская А.А., Серебрякова А.В.**

## **Изменение структуры органов пищеварения при инфицировании SARS-Cov-2 (экспериментальное исследование)**

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»,  
295051, Республика Крым, Симферополь, бульвар Ленина, д. 5/7

**Введение.** Наличие ангиотензинпревращающего фермента 2 и трансмембранной сериновой протеазы 2 на поверхности клеток многих органов дает основание предположить их повреждение при поражении вирусом SARS-Cov-2.

**Цель** исследования – изучение структуры крупных пищеварительных желез и кишечника после перенесенного заболевания в экспериментальной модели и проверка протективных свойств разработанной нами ДНК-вакцины на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСОН).

**Методика.** В модели заболевания использовали инфицированных гуманизированных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2, которым интраназально и внутримышечно вводили ДНК-вакцину, после чего исследовали органы пищеварительной системы.

**Результаты.** Показано, что среди органов пищеварительной системы наиболее чувствительной к вирусу является печень, демонстрирующая патологические изменения с первых дней эксперимента и до 30 сут наблюдения, наименьшим изменениям подвергся кишечник. Основные патологические изменения косались сосудистого русла, что привело к нарушению трофики органов и ухудшению их функциональной активности.

**Заключение.** Применение вакцины несколько снижало степень повреждения органов пищеварительной системы. Наиболее эффективным оказалось ее интраназальное введение.

**Ключевые слова:** SARS-Cov-2; вакцина; печень; поджелудочная железа; кишечник; морфология

**Для цитирования:** Остапенко О.В., Макалиш Т.П., Оберемок В.В., Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Юрченко К.А., Челкак Е.В., Галышевская А.А., Серебрякова А.В. Изменение структуры органов пищеварения при инфицировании SARS-Cov-2 (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 56-65.

DOI:10.25557/0031-2991.2023.04.56-65

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования — Оберемок В.В., Кубышкин А.В.; сбор материала – Юрченко К.А., Серебрякова А.В., Макалиш Т.П.; подготовка иллюстративного материала – Макалиш Т.П.; морфометрия и статистическая обработка – Челкак Е.В., Галышевская А.А.; написание текста статьи – Остапенко О.В., Макалиш Т.П., Оберемок В.В.; редактирование текста – Фомочкина И.И., Зяблицкая Е.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

**Для корреспонденции:** Макалиш Татьяна Павловна, e-mail: gemini\_m@list.ru

**Финансирование.** Исследование проводилось при финансовой поддержке Минобрнауки России: государственного задания № FZEG-2020-0060 «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий», а также частично – программы «Приоритет-2030» № 075-15-2021-1323.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.12.2022

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Ostapenko O.V., Makalish T.P., Oberemok V.V., Zyablitskaya E.Yu., Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Yurchenko K.A., Chelkak E.V., Galyshevskaya A.A., Serebryakova A.V.

## Changes in the structure of the digestive organs during SARS-Cov-2 infection (experimental study)

Vernadsky Crimean State University,  
295051, Lenina 5/7, Ave, Simferopol, Crimean Republic, Russian Federation

The presence of angiotensin-converting enzyme 2 and transmembrane serine protease 2 on the surface of cells in many organs suggests their damage after SARS-Cov-2 infection. The **aim** of the study was to investigate the structures of large digestive glands and intestines after a disease in an experimental model. And also to check the protective properties of the DNA vaccine based on antisense oligonucleotides.

**Methods.** Humanized B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2 mice were used in the disease model. They were intranasally and intramuscularly injected with a DNA vaccine, after that the organs of the digestive system were examined.

As a **result** the liver is the most sensitive to the virus. It demonstrates pathological changes from the first days of the experiment to 30 days of observation. The least affected is intestines. The main pathological changes were observed in the vessels.

**Conclusion.** The use of the vaccine promote a slightly protective from the damage to the organs of the digestive system. The most effective was its intranasal administration

**Keywords:** SARS-Cov-2, vaccine, liver, pancreas, intestines, morphology

**For citation:** Ostapenko O.V., Makalish T.P., Oberemok V.V., Zyablitskaya E.Yu., Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Yurchenko K.A., Chelkak E.V., Galyshevskaya A.A., Serebryakova A.V. Changes in the structure of the digestive organs during SARS-Cov-2 infection (experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 56-65. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.56-65

**Author's contribution:** the concept and design of the study – Oberemok V.V., Kubyshkin A.V., collection of material – Yurchenko K.A., Serebryakova A.V., Makalish T.P., preparation of illustrative material – Makalish T.P., morphometry and statistical processing – Chelkak E.V., Galyshevskaya A.A., writing the text of the article – Ostapenko O.V., Makalish T.P., Oberemok V.V., text editing – Fomochkina I.I., Zyablitskaya E.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** Tatyana P. Makalish, PhD, Leading Researcher of the Central Research Laboratory of the Institute «Medical Academy named after S.I. Georgievsky» V.I. Vernadsky CFU, e-mail: gemini\_m@list.ru

### Information about the authors:

Ostapenko O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2935-1985>

Makalish T.P., <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>

Oberemok V.V., <https://orcid.org/0000-0001-7472-2389>

Zyablitskaya E.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8216-4196>

Kubyshkin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1309-4005>

Fomochkina I.I., <https://orcid.org/0000-0003-3065-5748>

Yurchenko K.A., <https://orcid.org/0000-0002-0284-7059>

Chelkak E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2118-3884>

Galyshevskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4406-3540>

Serebryakova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4506-4465>

**Financing.** The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation: state task No. FZEG-2020-0060 «Algorithms for molecular genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies», and also partially – the program «Priority-2030» No. 075-15-2021-1323.

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

Received 21.12.2022

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Основным механизмом проникновения в ткани вируса SARS-Cov-2 считается его связывание с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) и трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2), которые являются рецепторами для S-белка суперкапсида вириона [1, 2]. Данные рецепторы присутствуют

не только на эпителии органов дыхательной системы, но также в большинстве органов желудочно-кишечного тракта, что объясняет такие нетипичные для респираторного заболевания проявления, как диарея, нарушение желчеобразования, диспепсия, изменение биохимических показателей крови [3, 4]. Данные про-

явления встречаются примерно у 15-20% заболевших, в том числе и у детей, для которых вирус SARS-Cov-2 считается менее патогенным [5].

На сегодняшний день в разработке находится большое количество вакцин против новой корона-вирусной инфекции, вызывающей тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), однако лишь немногие из них доказали свою эффективность и безопасность и допущены к производству и применению. В зависимости от применяемой технологии производства вакцины против COVID-19 (SAR-CoV-2) можно разделить на четыре платформы: РНК-вакцины, аденовирусные векторные вакцины, субъединичные (белковые) вакцины и инактивированные вирусные вакцины [6]. Все разрешенные РНК-вакцины построены схожим образом. Внутри липидных наночастиц находятся мРНК, кодирующие S-белок либо его часть. Попадая в клетки, мРНК транслирует синтез данного полипептида, на который и вырабатывается иммунный ответ [7, 8]. Схожим образом действуют и ДНК-вакцины [9] с той лишь разницей, что вместо мРНК они содержат кольцевые участки ДНК – плазмиды, которые трансформируются в мРНК уже внутри ядра клетки-хозяина. Однако большинство вакцин быстро устаревают вследствие частых мутаций вируса. Одной из перспективных стратегий является создание вакцин на основе консервативных последовательностей вирусных геномов с использованием олигонуклеотидов. Мы предлагаем аэрозольную вакцину против SARS-CoV-2, основанную на лассо-подобной конструкции фосфоротиоатных олигонуклеотидов, содержащих CpG-мотивы, и антигенпрезентирующей уникальной последовательности генома вируса [10]

**Цель** исследования – изучение изменений в органах пищеварительной системы, таких как кишечник, печень и поджелудочная железа, в экспериментальной модели ТОРС и при различных методах коррекции.

#### Методика

Данное исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» (01.10.2021 протокол № 25/21) При проведении экспериментальных исследований соблюдали принципы и положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (USNIH, № 85-23), международных правил «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (2009 г.) с учетом Конвенции Совета Европы о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.)

Олигонуклеотидная последовательность, включающая CpG-мотив как активирующий иммунную систему компонент и последовательность, кодирующую вирусный белок как антигенпрезентирующую часть, использована как вакцина, которую в дозировке 30 мкл в концентрации 1000 нг/мл вводили интраназально или внутримышечно животным экспериментальных групп за 2 недели до моделирования ТОРС.

В качестве модельных животных использовали гуманизированных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2 (The Jackson Laboratory, США) обоих полов раннего зрелого возраста массой от 25 грамм в количестве 60 штук. Животные были разделены на 4 группы: 1-я – интактные животные ( $n=6$ ), 2-я животные с моделью ТОРС ( $n=18$ ), 3-я – интраназально вакцинированные животные с последующим моделированием ТОРС ( $n=18$ ); 4-я – внутримышечно вакцинированные животные с последующим моделированием ТОРС ( $n=18$ ). На 5-е сут после интраназального заражения вирусными частицами штамма Омикрон наблюдали выраженные признаки инфекции, проявлявшиеся в виде гипертермии, синюшности ушей, сниженной активности, расстройстве пищеварения. Животных выводили из эксперимента под наркозом (хлоргидрат, 200 мг/кг подкожно), на 5-, 10- и 30-е сут после заражения.

Для морфометрического исследования брали участки поджелудочной железы (ПЖ), печени, двенадцатиперстной (ДК) и толстой кишки (ободочную кишку, ОК). Фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 ч, проводили дегидратацию и пропитку парафином по стандартному протоколу. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, просматривали под микроскопом DM2000 с камерой DFC295 (Leica, Германия) и сканировали (сканер Aperio CS2, Leica, США).

Морфометрию проводили с использованием ПО Aperio ImageScore v. 12.4.6. Во всех органах методом точек определяли относительные площади, занимаемые паренхимой и стромально-сосудистым компонентом. В пищеварительных железах рассчитывали ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС) функциональных клеток. В ПЖ определяли размеры островков Лангерганса, в кишечнике – размеры ворсин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО STATISTICA 10.0. Нормальность распределения признака определяли методом Шапиро-Уилка. При нормальном распределении высчитывали среднее значение признака и среднее квадратическое отклонение. При распределении признака, отличном от нормального, определяли медиану, верхний и ниж-

ний квартили. Различия между группами определяли методом сравнения множественных выборок методом Краскела-Уоллиса при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ .

*Исследование проводилось с использованием приборов центра коллективного пользования оборудованием «Молекулярная биология» центральной научно-исследовательской лаборатории института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».*

### Результаты

При моделировании ТОРС отмечаются нарушения структурно-функциональной организации больших пищеварительных желез. В печени деструктурированы печеночные дольки, нарушен характерный ход печеночных балок. Паренхима представлена гепатоцитами, размеры которых сильно варьируют от мелких до крупных, гипертрофированных (табл. 1). Среди 1-2 ядерных клеток преобладают ядра с эухроматином, в цитоплазме отмечаются признаки жировой дистрофии (рис. 1). Присутствуют клетки с некротически измененными ядрами. К концу эксперимента (30-е сут) снижается количество двуядерных клеток, что свидетельствует о слабом регенераторном потенциале. В расширенных сосудах визу-

лизируется сладж эритроцитов, стаз, отмечается периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация.

При использовании вакцины на начальных этапах (5-е сут) эксперимента со стороны пищеварительных желез существенных изменений не наблюдалось. Стромальный компонент практически не отличался от такового контрольной группы. Система выводных протоков без изменений. Просвет протоков не спазмирован, содержит слабозозинофильный секрет. Сосудистое русло сохраняет свою целостность. Можно заметить единичное фрагментарное сужение капилляров. С течением эксперимента (10-е сут) появляются более явные признаки повреждения органа в виде нарушения хода балок, признаков апоптоза, изменение размеров гепатоцитов, жировой дистрофии и как следствие уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения. Наименее выраженными эти явления были в группе с интраназальным введением вакцины.

В эндокринной части ПЖ с течением эксперимента наблюдали уменьшение размеров островков Лангерганса (табл. 2), а также размеров экзокриноцитов, сопровождавшееся ростом ядерно-цитоплазматического соотношения, что свидетельствует о снижении функциональной активности клеток. Морфологически это проявлялось в нарушении зональности цитоплаз-

Таблица 1/ Table 1

#### Морфометрические характеристики печени мышей контрольной и экспериментальных групп (M±Sd)

#### Morphometric characteristics of the liver of mice in the control and experimental groups (M±Sd)

Группа Group	Срок выведения из эксперимента, сутки Period of withdrawal from the experiment, days	Площадь гепатоцита, мкм <sup>2</sup> hepatocyte area, $\mu\text{m}^2$	Площадь ядра гепатоцита, мкм <sup>2</sup> Hepatocyte nucleus area, $\mu\text{m}^2$	Ядерно-цитоплазматическое соотношение Nuclear-cytoplasmic ratio
1-я Интактная Intact	30	255,47±50,79	47,98±10,26	0,24±0,07
2-я Модель ТОРС/SARS Model	5	282,66±60,84	46,11±11,09	0,20±0,04
	10	294,32±48,98	38,65±9,66	0,15±0,03*
	30	381,21±71,71**	55,31±12,82	0,17±0,03
3-я Внутримышечное введение вакцины Intramuscular vaccine	5	267,67±43,34	60,80±13,67°	0,30±0,08
	10	303,87±93,32	54,23±15,50°	0,23±0,08°
	30	260,19±49,72°	47,79±11,17	0,23±0,06°
4-я Интраназальное введение вакцины Intranasal vaccine	5	278,15±71,59	40,33±8,19	0,18±0,06
	10	458,88±96,71*°	43,67±10,94	0,11±0,03**
	30	392,94±73,79**	41,70±7,88°	0,12±0,03*°

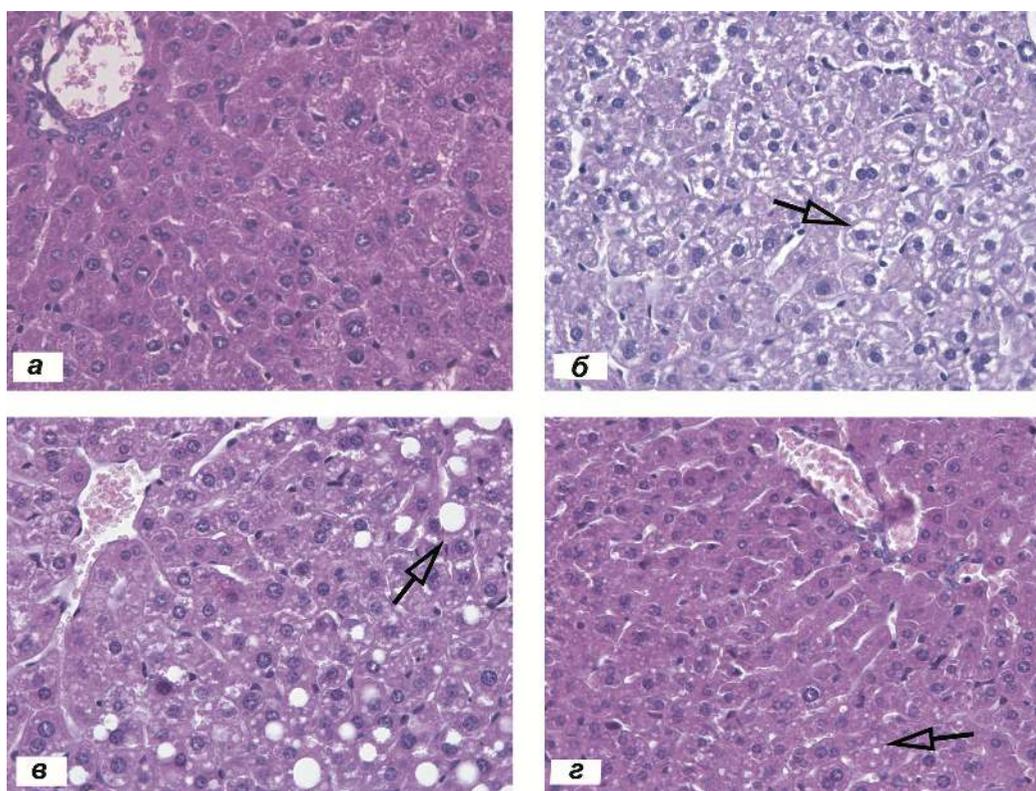
**Примечание.** \* – отличия от интактной группы, ° – отличия от модели (2-я группа) в соответствующие сроки, ◆ отличия в разные сроки внутри своей группы.

**Notes.** \* differences from the intact group, ° differences from the model in the relevant time frame, ◆ differences in different terms within their group.

мы экзокриноцитов. На поздних сроках эксперимента встречались клетки с признаками некроза или апоптоза (гиперхромные или неправильной формы вакуолизованные ядра, вакуолеобразные просветления в цитоплазме). В группах вакцинированных животных данные явления были менее выражены, особенно при интраназальном введении. Статистической значимости, выявленные отличия не имели (рис. 2).

В кишечнике наиболее яркими проявлениями повреждения стали отек собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы, в результате чего заметно изменились размеры ворсин в сторону уменьшения их высоты и утолщения с параллельным увеличением высоты эпителия, что особенно заметно в модели ТОРС (табл. 3, рис. 3). Основа ворсин сильно разволокнена, сосуды расширены, преобладают лимфоидные элементы. Все свидетельствует о нарушении микроциркуляторного русла. Эпители-

альная пластика ДК частично разрушена. Встречаются некротические и апоптозные клетки, часть которых слущивается. Энтероциты с признаками дистрофии, в околоядерной зоне имеются просветления. Щеточная каемка истончается, но не исчезает. Бокаловидных клеток очень мало. Также отмечается небольшое количество клеток Панета, количество гранул в которых также снижено. Аналогичная картина отмечается и в ОК. Качественный и количественный состав секрета бокаловидных клеток существенно варьирует. Окраска бокаловидных клеток неоднородна: от неокрашенных, слабоацидофильных, до синих базофильных. К концу наблюдений в кишечнике нарастают признаки воспалительного процесса: наличие активных макрофагов, расширенные лимфатические капилляры, увеличение клеток Панета. Применение вакцины оказало такой же эффект, как и в пищеварительных железах, а именно значитель-



**Рис. 1.** Морфология печени экспериментальных животных.

Гематоксилин-эозин. Ув. 400х. а – интактная группа, б – группа с моделью ТОРС, в – группа внутримышечно вакцинированных мышей, г – группа интраназально вакцинированных мышей. Стрелками обозначены места гидропической и жировой дистрофии.

**Fig. 1.** Morphology of the liver of experimental animals.

Hematoxylin-eosin. Magnification 400x. a/a – intact group, б/б – SARS model group, в/в – a group of intramuscularly vaccinated mice, д/д – a group of intranasally vaccinated mice. The arrows indicate the places of hydropic and fatty degeneration.

ное нивелирование описанных нарушений в строении ДК и ОК.

### Обсуждение

По данным литературы у пациентов, перенесших ТОРС, наблюдали нарушение белково-синтетической функции, поражение гепатоцитов [11]. Гистологически основными проявлениями повреждения печени являлись нарушение микроциркуляции, стаз эритроцитов, тромбоз сосудов печени, а также очаги некроза паренхимы [12]. Также среди особенностей морфологии поврежденной вирусом печени является баллонная дистрофия гепатоцитов, наблюдаемая нами в подавляющем числе препаратов в большей или меньшей степени выраженности, а также увеличение числа двуядерных клеток как компенсаторная реакция на повреждение [13]. Наблюдаемая нами картина поражения печени в модели ТОРС вполне согласуется с данными этих исследований.

Повреждение ПЖ, как экзокринной, так и эндокринной ее частей, является многофакторным: 1) прямое опосредованное вирусом повреждение экзокринной части поджелудочной железы через рецепторы ACE2 и TMPRSS2; 2) повреждение провоспалительной средой из-за высоких уровней цитокинов и нарушения иммунной регуляции; 3) вирус-индуцированная липотоксичность из-за нарушения работы Na<sup>+</sup>/

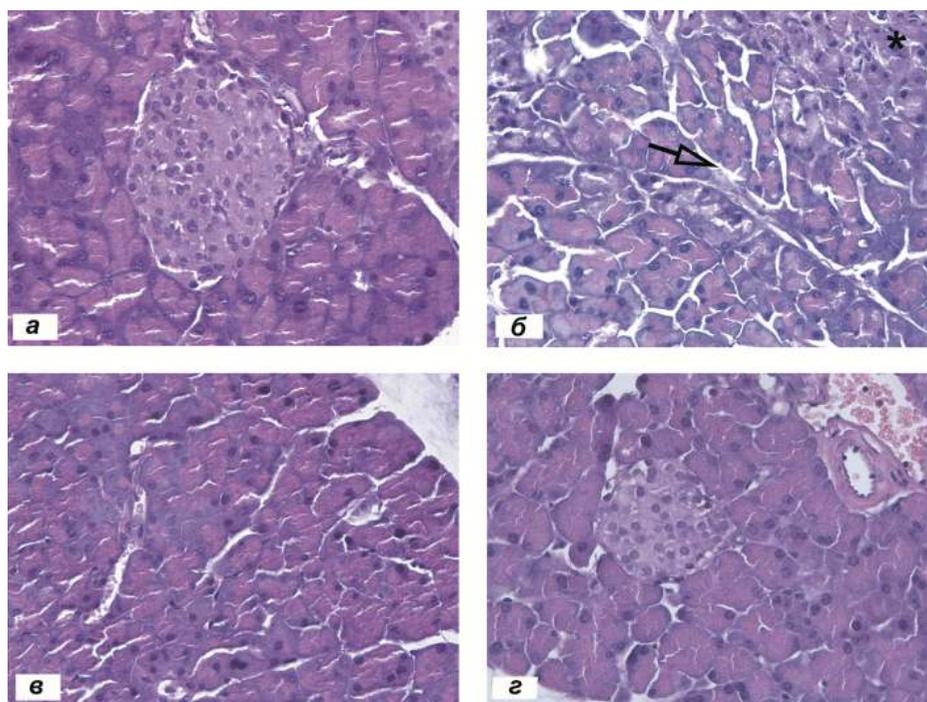
H<sup>+</sup> каналов, вызывающих гиперлипидемию; 4) медикаментозное повреждение поджелудочной железы (из-за нестероидных противовоспалительных препаратов и кортикостероидов) [14], что в случае нашего эксперимента исключается. По данным исследований [15] вирус SARS-Cov может проникать в клетки островков Лангерганса используя ACE2 в качестве своего рецептора. Это вызывает нарушение обмена углеводов у больного, что, однако, может носить временный характер. ACE2 в поджелудочной железе экспрессируется главным образом в перипанкреатических микрососудах и в меньшей степени на поверхности островков Лангерганса, включая β-клетки [16], что вызывает более раннее прямое повреждение экзокриноцитов [17], наблюдаемое нами в эксперименте. Данных по патологоанатомическим исследованиям поджелудочной железы недостаточно [14]. Одни исследователи отмечают дистрофические и некротические изменения в островковых клетках на фоне сохранной экзокринной части [18], другие встречали признаки очагового панкреатита и геморрагические некротические изменения [19], что вполне соотносится с данными наших экспериментальных исследований. В модели ТОРС без коррекции нарушение функционирования поджелудочной железы заметно уже на 5-е сут. При этом экзокринная и эндокринная части реагируют на повреждение с разной скоро-

Таблица 2/ Table 2

#### Морфометрические характеристики поджелудочной железы мышей контрольной и экспериментальных групп (M±Sd)

#### Morphometric characteristics of the pancreas of mice in the control and experimental groups (M±Sd)

Группа Group	Срок выведения из эксперимента, сут. Period of withdrawal from the experiment, days	Площадь островка Лангерганса, мкм <sup>2</sup> Area of the islet of Langerhans, μm <sup>2</sup>	Диаметр островка Лангерганса, мкм Diameter of an islet of Langerhans, μm	Площадь экзокриноцита, мкм <sup>2</sup> Exocrinocyte area, μm <sup>2</sup>	Площадь ядра экзокриноцита, мкм <sup>2</sup> Exocrinocyte nucleus area, μm <sup>2</sup>	Ядерно-цитоплазматическое соотношение Nuclear-cytoplasmic ratio
1-я Интактная Intact	30	14013,18±10247,35	163,22±78,80	459,22±106,48	38,54±12,29	0,10±0,04
2-я Модель ТОРС SARS Model	5	15632,73±6945,00	180,95±48,29	476,97±81,06	39,88±24,54	0,10±0,09
	10	12052,57±8288,31	137,78±50,47	312,87±109,46	35,29±12,55	0,14±0,07
	30	13759,75±7657,40	193,21±80,89	269,62±137,81	33,35±14,05	0,16±0,06
3-я Внутримышечное введение вакцины Intramuscular vaccine	5	13475,78±16501,11	138,02±100,30	389,54±75,37	26,88±6,42	0,08±0,03
	10	9074,91±3802,26	126,72±27,26	465,47±184,19	36,86±4,35	0,10±0,04
	30	10214,19±5648,21	129,61±25,34	271,64±97,99	21,26±9,95	0,10±0,05
4-я Интраназальное введение вакцины Intranasal vaccine	5	15522,63±3302,36	170,37±41,60	334,36±182,12	26,40±12,67	0,09±0,02
	10	14063,67±1492,18	169,23±21,56	319,07±115,85	29,74±0,43	0,11±0,07
	30	14165,51±4151,04	161,26±38,35	386,84±49,58	28,97±8,94	0,10±0,03



**Рис. 2.** Морфология поджелудочной железы экспериментальных животных. Гематоксилин-эозин. Ув. 400х. а – интактная группа, б – группа с моделью ТОРС, в – группа внутримышечно вакцинированных мышей, г – группа интраназально вакцинированных мышей. Стрелкой обозначен отек стромы железы, \* - группа клеток с признаками апоптоза.

**Fig. 2.** Morphology of the pancreas of experimental animals. Hematoxylin-eosin. Magnification 400x. a/a – intact group, b/b – SARS model group, c/c – a group of intramuscularly vaccinated mice, d/d – a group of intranasally vaccinated mice. The arrow indicates the edema of the gland stroma, \* – a group of cells with signs of apoptosis.

Таблица 3/ Table 3

**Морфометрические характеристики слизистой оболочки тонкой кишки мышей контрольной и экспериментальных групп (M±Sd)**

**Morphometric characteristics of the mucous membrane of the small intestine of mice of the control and experimental groups (M±Sd)**

Группа / Group	Срок выведения из эксперимента, дней Period of withdrawal from the experiment, days	Высота ворсин, мкм Villus height, μm	Ширина ворсин, мкм Width of villi, microns	Высота эпителия, мкм Epithelium height, μm
Интактная Intact	30	387,81±62,57	63,25±10,78	20,12±4,49
Модель ТОРС SARS Model	5	338,41±126,59	73,73±13,93	22,65±3,34
	10	327,95±128,27	88,33±13,15	24,58±5,35
	30	303,61±76,67	100,55±28,30	39,44±4,78**
Внутримышечное введение вакцины Intramuscular vaccine	5	375,64±45,74	62,76±9,46	23,53±3,62
	10	386,30±56,94	65,05±8,37	22,62±3,98
	30	385,34±47,24	64,26±7,28°	23,53±3,62°
Интраназальное введение вакцины Intranasal vaccine	5	382,34±41,51	64,54±5,01	22,19±3,03
	10	370,82±66,26	73,65±8,78	34,25±8,12**
	30	380,91±62,45	63,18±6,04°	23,64±4,66°

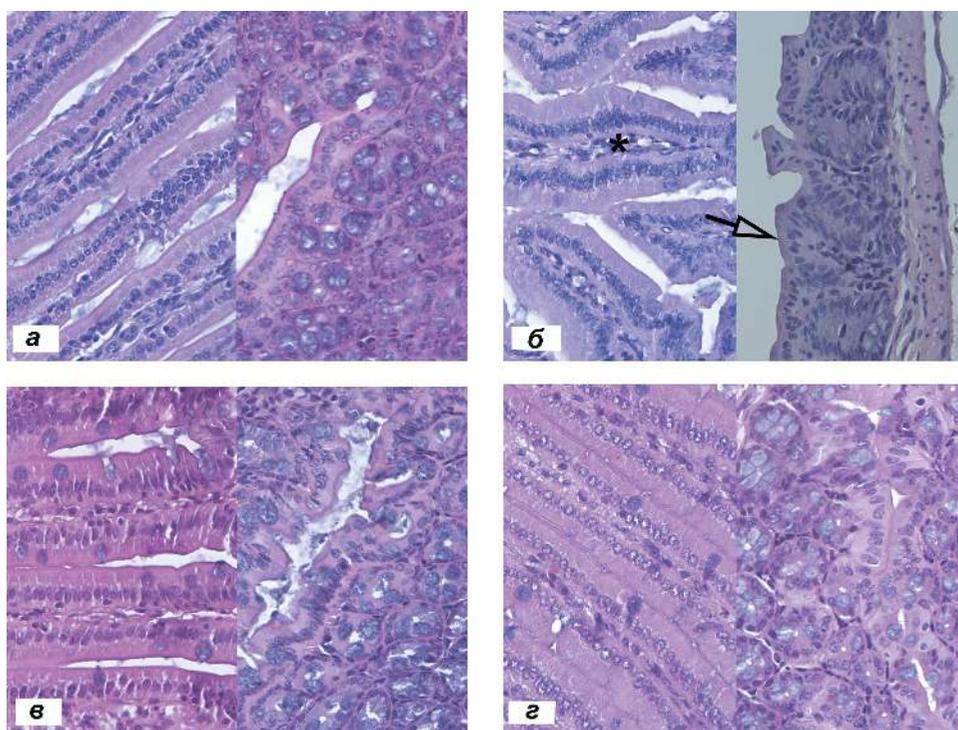
**Примечание.** \* – отличия от интактной группы, ° – отличия от модели в соответствующие сроки, ◆ – отличия в разные сроки внутри своей группы.

**Notes.** \* – differences from the intact group, ° – differences from the model in the relevant time frame, ◆ – differences in different terms within their group.

стью. Экзокриноциты демонстрируют признаки повреждения уже на ранних стадиях наблюдения, к 10-м суткам начиная компенсаторное восстановление и проявляя заметный потенциал к регенерации. Эндокринная же часть подвергается повреждению несколько позже, а к 30-м сут ее состояние становится еще хуже. В группе животных, получавших внутримышечную вакцину, наиболее заметными были изменения микроциркуляторного русла, что не могло не сказаться на состоянии паренхимы железы. Данные изменения прогрессировали с течением болезни. Наиболее благоприятным оказалось состояние железы у животных, получавших интраназально вакцину. Изменения в клетках были наименее значительными и развились лишь на 10-е сут, прогрессируя с течением эксперимента.

При SARS-CoV присутствие вируса было обнаружено в эпителиальных клетках тонкой и толстой кишки, в которых он также проявлял особенности репликации [20]. В исследованном авторами аутопсийном

и биопсийном материале ободочной и подвздошной кишок каких-либо патологических изменений обнаружено не было, помимо гистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой. Отмечались случаи нарушения гемодинамики в органах ЖКТ в виде микротромбов, отеков и гиперемии [21]. Наиболее частыми проявлениями поражения различных отделов пищеварительной трубки являлась лимфоплазмацитарная инфильтрация наряду с интерстициальным отеком собственной пластинки желудка, двенадцатиперстной кишки и прямой кишки [23-25]. Данные, полученные в результате нашего исследования, оказались во многом сопоставимы с данными литературы. Во всех экспериментальных группах в большей или меньшей степени наблюдались отек и разволокнение собственной пластинки слизистой, а также подслизистой основы, в результате чего изменялись толщина и высота ворсин ДК. Однако статистически значимой разницы по сравнению со здоровой слизистой они не носили. Также встречались признаки воспале-



**Рис. 3.** Морфология двенадцатиперстной (слева) и ободочной (справа) кишки экспериментальных животных. Гематоксилин-эозин. Ув. 400. а – интактная группа, б – группа с моделью ТОРС, в – группа внутримышечно вакцинированных мышей, г – группа интраназально вакцинированных мышей. Стрелкой обозначено снижение высоты эпителия и уменьшение числа железистых клеток, \* - отек стромы и утолщение ворсинки тонкой кишки.

**Fig. 3.** Morphology of the duodenum (left) and colon (right) of experimental animals. Hematoxylin-eosin. Magnification 400. a/a – intact group, b/b – SARS model group, c /в – a group of intramuscularly vaccinated mice, d/l/r – a group of intranasally vaccinated mice. The arrow indicates a decrease in the height of the epithelium and a decrease in the number of glandular cells, \* - edema of the stroma and thickening of the villi of the small intestine.

ния в виде повышения числа лимфоцитов и макрофагов в толще ворсин, более выраженные в группе модели ТОРС без коррекции и в группе с внутримышечной вакциной. В этих же группах обратило на себя внимание уменьшение числа бокаловидных клеток особенно в ОК, а также изменение химического состава секретируемой ими слизи. По данным исследователей [26] отмечается перераспределение нейтральных и кислых мукополисахаридов при развитии патологических процессов. Данные изменения, однако, могут быть обусловлены особенностями животной модели и экстраполировать их на человека следует с особой осторожностью.

### Заключение

Наличие ACE2 и TMPRSS2 на поверхности клеток органов желудочно-кишечного тракта делает их уязвимыми для вируса SARS-CoV-2. Наиболее подвержена повреждениям печень ввиду своей фильтрующей и детоксикационной функции, а также влиянию лекарственных препаратов, используемых при лечении новой коронавирусной инфекции. Второй по степени подверженности повреждениям является поджелудочная железа. Наиболее чувствительной, но и быстрее восстанавливающейся от повреждений является ее экзокринная часть. Наименее подвержен влиянию вирусных частиц оказался кишечник. Несмотря на множественные проявления в виде диареи, тошноты и рвоты, гистологические исследования выявили лишь нарушения гемодинамики и лимфоидную инфильтрацию.

При моделировании CAPC нами наблюдались характерные для исследуемых органов изменения, описанные в литературе. Применение вакцины на основе АСОН в некоторой степени нивелировало эти проявления. Наиболее эффективным оказалось интраназальное введение вакцины, так как патологические проявления в этой группе были минимальными, за исключением печени. Аналогичный результат был получен нами ранее и при исследовании легкого.

Таким образом, можно заключить, что использование вакцины на основе АСОН перспективно в плане снижения патологических изменений в органах пищеварительной системы при новой коронавирусной инфекции.

### Литература

#### (п.п. 1-10; 12-25 см. References)

- Ильченко Л.Ю., Никитин И.Г., Федоров И.Г. COVID-19 и поражение печени. *Архивъ внутренней медицины*. 2020; 10(3): 188-97. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-3-188-197.

- Бахтин А.А. Особенности гистохимических показателей в тонкой кишке при воздействии неблагоприятных экологических факторов. *Современные проблемы науки и образования*. 2012; 1. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=5345>

### References

- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2): 271–80. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
- Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., Nair N., Mahajan S., Sehrawat T.S., et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nature Medicine*. 2020. doi: 10.1038/s41591-020-0968-3
- Wang F., Wang H., Fan J., Zhang Y., Wang H. Qiu Z. Pancreatic injury patterns in patients with COVID-19 pneumonia. *Gastroenterology*. 2020; 159(1):367-370. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.055>
- Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L., Lely A.T., Navis G., van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology*. 2004; 203(2): 631-7.
- Mao R., Qiu Y., He J.S., Tan J.Y., Li X.H., Liang J., et al. Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterology and Hepatology*. 2020; 5(7): 667-78. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30126-6
- Alagheband Bahrami A., Azargoonjahromi A., Sadraei S., Aarabi A., Payandeh Z., Rajabibazl M. An overview of current drugs and prophylactic vaccines for coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2022; 27(1): 38. doi: 10.1186/s11658-022-00339-3
- Rosenblum H.G., Hadler S.C., Moulia D., Shimabukuro T.T., Su J.R., Tepper N.K., et al. Use of COVID-19 Vaccines After Reports of Adverse Events Among Adult Recipients of Janssen (Johnson & Johnson) and mRNA COVID-19 Vaccines (Pfizer-BioNTech and Moderna): Update from the Advisory Committee on Immunization Practices – United States, July 2021. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2021; 70(32): 1094-9. doi: 10.15585/mmwr.mm7032e4. PMID: 34383735
- Dolgin E. CureVac COVID vaccine let-down spotlights mRNA design challenges. *Nature*. 2021;594(7864):483. doi: 10.1038/d41586-021-01661-0
- Mallapaty S. India's DNA COVID vaccine is a world first—more are coming. *Nature*. 2021; 597(7875): 161–2. doi: 10.1038/d41586-021-02385-x
- Oberemok V.V., Laikova K.V., Yurchenko K.A. Marochkin N.A. Fomochkina I.I., Kubyshev A.V. SARS-CoV-2 will constantly sweep its tracks: a vaccine containing CpG motifs in 'lasso' for the multifaceted virus. *Inflammation Research*. 2020; 69: 801–12. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01377-3>
- Il'chenko L.Yu., Nikitin I.G., Fedorov I.G. COVID-19 and liver damage. *Архивъ внутренней медицины*. 2020; 10(3): 188-97. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-3-188-197. (in Russian)
- Hanley B., Lucas S.B., Youd E., Swift B., Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *Journal of Clinical Pathology*. 2020; 73(5): 239-42. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206522
- Chau T.N., Lee K.C., Yao H., Tsang T.Y., Chow T.C. Yeung Y.C., et al. SARS-associated viral hepatitis caused by a novel coronavirus: report of three cases. *Hepatology*. 2004; 39: 302-10. <https://doi.org/10.1002/hep.20111>

14. Samanta J., Gupta R., Singh M.P., Patnaik I., Kumar A., Kochhar R. Coronavirus disease 2019 and the pancreas. *Pancreatology*. 2020; 20(8): 1567–75. doi: 10.1016/j.pan.2020.10.035
15. Yang J.K., Lin S.S., Ji X.J., Guo L.M. Binding of SARS coronavirus to its receptor damages islets and causes acute diabetes. *Acta Diabetologica*. 2010; 47: 193–9. doi: 10.1007/s00592-009-0109-4
16. Fignani D., Licata G., Brusco N., Nigi L., Grieco G.E., Marselli L. et al. SARS-CoV-2 Receptor Angiotensin I-Converting Enzyme Type 2 (ACE2) Is Expressed in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells and in the Human Pancreas Microvasculature. *Frontiers of Endocrinology*. 2020; 11: 596898. doi: 10.3389/fendo.2020.596898
17. Janis A. Müller J.A., Groß R., Conzelmann C., Krüger C., Merle U., et al. SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nature Metabolism*. 2021; 3(2): 149–165. doi: 10.1038/s42255-021-00347-1
18. Yao X., Li T., He Z., Ping Y., Liu H., Yu S., et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimally invasive autopsies. *Chin Journal of Pathology*. 2020; 49: 411–7.
19. Hanley B., Naresh K.N., Roufousse C., Nicholson A.G., Weir J., Cooke G.S., et al. Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study. *The Lancet. Microbe*. 2020. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30115-4
20. Leung W.K., To K., Chan P.K., Chan H.L., Wu A.K., Lee N., et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*. 2003; 125: 1011–7. doi: 10.1016/j.gastro.2003.08.001
21. Peiris S., Mesa H., Aysola A., Manivel J., Toledo J., Borges-Sa M. et al. Pathological findings in organs and tissues of patients with COVID-19: A systematic review. *PLoS One*. 2021; 16(4): e0250708. doi: 10.1371/journal.pone.0250708
22. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020; 158(6). doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.055. 1831–1833.e3
23. Carvalho A., Alqusairi R., Adams A., Paul M., Kothary N., Peters S. SARS-CoV-2 gastrointestinal infection causing hemorrhagic colitis: implications for detection and transmission of COVID-19 disease. *The Armenian Journal of Gastroenterology*. 2020; 115(6): 942–6. doi: 10.14309/ajg.0000000000000667
24. Singh A., Zaheer S., Kumar N., Singla T., Ranga S. Covid19, beyond just the lungs: A review of multisystemic involvement by Covid19. *Pathology – Research and Practice*. 2021; 224: 153384. doi: 10.1016/j.prp.2021.153384
25. Livanos A.E., Jha D., Cossarini F., Gonzalez-Reiche A.S., Tokuyama M., Aydillo Tet al. Intestinal Host Response to SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Outcomes in Patients With Gastrointestinal Symptoms. *Gastroenterology*. 2021; 160(7): 2435–2450.e34. doi: 10.1053/j.gastro.2021.02.056
26. Bakhtin A.A. Features of histochemical parameters in the small intestine under the influence of adverse environmental factors. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2012; 1. <https://science-education.ru/ru/article/view?id=5345> (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Остапенко Ольга Валерьевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела биомедицинских технологий инженерингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии» ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»;

**Макаши Татьяна Павловна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»;

**Оберемок Владимир Владимирович**, доктор биол. наук, доцент, зав. каф. молекулярной генетики и биотехнологий Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»;

**Зяблицкая Евгения Юрьевна**, доктор мед. наук, доцент, вед. науч. сотр. ЦНИЛ Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»;

**Кубышкин Анатолий Владимирович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей и клинической патофизиологии Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»;

**Фомочкина Ирина Ивановна**, доктор мед. наук, проф., каф. общей и клинической патофизиологии Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»;

**Юрченко Ксения Андреевна**, аспирант каф. молекулярной генетики и биотехнологий Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

**Челкак Екатерина Вячеславовна**, лаборант ЦНИЛ Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»;

**Гальшевская Анна Александровна**, студент, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»;

**Серебрякова Анна Валерьевна**, ординатор каф. патологической анатомии Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

Кузнецов Ю.С.<sup>2</sup>, Дурлештер В.М.<sup>1,2</sup>, Маркин В.В.<sup>2</sup>, Мирцхулава Н.Г.<sup>2</sup>, Крячко А.А.<sup>1,2</sup>, Щупляк С.В.<sup>2</sup>,  
Мурашко Д.С.<sup>1,2</sup>, Рудько В.А.<sup>2</sup>

## Пневмомедиастинум как предиктор негативного прогноза у больных с коронавирусной пневмонией

<sup>1</sup>ФПК и ППС ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 350063, Краснодар, Россия, ул. Седина, д. 4;

<sup>2</sup>ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2 КМЛДО, 350012, Краснодар, Россия, ул. Красных Партизан, д. 6

**Цель.** Анализ особенностей течения коронавирусной пневмонии у больных с пневмомедиастинумом.

**Методика.** В исследование включены данные 139 пациентов, из которых у 71 на фоне коронавирусной пневмонии развился спонтанный пневмомедиастинум. Был проведен анализ и сравнение лабораторных, клинических и рентгенологических данных.

**Результаты.** Выявлена взаимосвязь между тяжестью вирусной пневмонии (3-4-я степень тяжести по данным МСКТ) и развитием пневмомедиастинума. Установлено, что спонтанная эмфизема средостения у больных с COVID-19 значимо чаще приводит к развитию острого респираторного синдрома, полиорганной недостаточности и способна выступать предиктором негативного прогноза исхода заболевания.

**Заключение.** Пневмомедиастинум у больных с вирусной пневмонией вызванной новой коронавирусной инфекцией COVID-19 выступает фактором крайне неблагоприятного прогноза и предиктором тяжелого течения заболевания. При нарастании спонтанной эмфиземы средостения без пневмоторакса рекомендуется выполнять медиастинотомию по Разумовскому, а в случае наличия клинически значимого сопутствующего пневмоторакса – дренирование плевральной полости.

**Ключевые слова:** COVID-19; пневмония; пневмомедиастинум; неблагоприятный прогноз

**Для цитирования:** Кузнецов Ю.С., Дурлештер В.М., Маркин В.В., Мирцхулава Н.Г., Крячко А.А., Щупляк С.В., Мурашко Д.С., Рудько В.А. Пневмомедиастинум как предиктор негативного прогноза у больных с коронавирусной пневмонией. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 66-72.

DOI:10.25557/0031-2991.2023.04.66-72

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Дурлештер В.М., Кузнецов Ю.С.; сбор и обработка материала – Кузнецов Ю.С., Рудько В.А.; статистическая обработка – Кузнецов Ю.С., Мурашко Д.С.; написание текста – Кузнецов Ю.С., Маркин В.В.; редактирование – Мирцхулава Н.Г., Щупляк С.В.; Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Кузнецов Юрий Сергеевич, e-mail: znecoynura@yandex.ru

Поступила 12.09.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Kuznetsov Y.S.<sup>2</sup>, Durlsheter V.M.<sup>1,2</sup>, Markin V.V.<sup>2</sup>, Mircxylava N.G.<sup>2</sup>, Krachko A.A.<sup>1,2</sup>, Shyplak S.V.<sup>2</sup>, Murashko D.S.<sup>1,2</sup>, Rudko V.A.<sup>2</sup>

## Pneumomediastinum as a predictor of adverse outcome in patients with coronavirus pneumonia

<sup>1</sup>Department of Surgery #3, School of Advanced Training and Professional Retraining of Specialists, Kuban State Medical University, Sedina St. 4, Krasnodar, 350063, Russian Federation;

<sup>2</sup>Regional Clinical Hospital #2, Krasnodar Municipal Therapeutic and Diagnostic Association, Krasnykh Partizan St. 6, Krasnodar, 350012, Russian Federation

**Aim.** Analysis of the course of coronavirus pneumonia in patients with pneumomediastinum.

**Methods.** The study included 139 patients, 71 of whom developed spontaneous pneumomediastinum associated with coronavirus pneumonia. Laboratory, clinical and radiological data were analyzed and compared.

**Results.** An association between severity of viral pneumonia (multispiral computed tomography severity score 3-4) and pneumomediastinum was found. Spontaneous mediastinal emphysema in patients with COVID-19 significantly more often resulted in the development of acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure and can be a predictor of adverse outcome.

**Conclusion.** Pneumomediastinum in patients with viral pneumonia caused by new coronavirus infection COVID-19 is a factor of extremely unfavorable prognosis and a predictor of severe course of the disease. In progressive spontaneous mediastinal emphy-

sema without pneumothorax, Razumovsky mediastinotomy is recommended, and in case of clinically significant concomitant pneumothorax, drainage and revision of the mediastinum should be considered.

**Keywords:** COVID-19; pneumonia; pneumomediastinum; unfavorable prognosis; drainage

**For citation:** Kuznetsov Y.S., Durlshter V.M., Markin V.V., Mircxylava N.G., Krachko A.A., Shyplak S.V., Murashko D.S., Rudko V.A. Pneumomediastinum as a predictor of adverse outcome in patients with coronavirus pneumonia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 66-72. (in Russian) DOI:10.25557/0031-2991.2023.04.66-72

Author's contribution: the concept and design of the study – Kuznetsov Y.S., Durlshter V.M.; collection and processing of the material – Kuznetsov Y.S., Rudko V.A.; statistical processing of the material – Kuznetsov Y.S., Murashko D.S.; writing the text – Kuznetsov Y.S., Markin V.V.; editing the text – Mircxylava N.G., Shyplak S.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

**For correspondence:** Yuriy S. Kuznetsov, Surgeon, Regional Clinical Hospital No.2, e-mail: kuznecoyura@yandex.ru

**Information about the authors:**

Durlshter V.M., <https://orcid.org/0000-0003-2885-7674>

Kuznetsov Y.S., <https://orcid.org/0000-0003-1593-9371>

Krachko A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6399-2340>

Murashko D.S., <https://orcid.org/0000-0003-4655-7368>

**Financing.** The study had no sponsorship.

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

Received 12.09.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Всемирной организацией здравоохранения 11 марта 2020 года было объявлено о пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), а уже по состоянию на 12 мая 2020 г. зарегистрировано 4 058 252 подтвержденных случаев заражения вирусом SARS-CoV-2 из которых 281 736 случаев смерти [1]. В период пандемии пациенты с вирусной пневмонией вызванной COVID-19 в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) составляют основную категорию больных. Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) развивается у 80-90% больных, госпитализированных в ОРИТ, что является показателем тяжести течения вирусной пневмонии [2].

В апреле 2020 г. J. Wang и соавт. впервые был описан случай летального исхода у больного с COVID-19 с эмфиземой средостения. Было отмечено, что наличие спонтанной эмфиземы средостения (СЭС) возможно может указывать на неблагоприятный прогноз исхода заболевания [3]. Позднее V. Mohan был описан еще один случай СЭС, где сообщалось, что развитие пневмомедиастинума являлось причиной выполнения дополнительных диагностических мероприятий [4]. Точные патогенетические механизмы развития пневмомедиастинума у больных вирусной пневмонией неизвестны, однако предполагаемой причиной является так называемый эффект Macklin. В основе эффекта Macklin лежит характерное для ОРДС диффузное альвеолярное повреждение, кото-

рое инициировано вирусной инфекцией, вследствие чего происходит разрыв альвеол за счет повышения внутриальвеолярного давления и последующая циркуляция альвеолярного воздуха по направлению к средостению через бронховаскулярные оболочки [5].

В настоящее время в международных клинических рекомендациях отсутствуют указания по ведению пациентов с пневмомедиастинумом и COVID-19. Однако, появляется все больше работ посвященных разработке единого лечебно-диагностического алгоритма к ведению пациентов с COVID-19 и такими осложнениями как эмфизема средостения, пневматоцеле и пневмоторакс [6, 7]. Так, в работе A. Sihoe и соавт. рекомендуется следовать принципам безопасной ИВЛ при коронавирусной пневмонии, что выступает мерой профилактики СЭС [8], то есть поддержание безопасных объемных (4-8 мл/кг) показателей и давления плато менее 30 см вод. ст. Авторами не описывается хирургическое вмешательство, как способ коррекции пневмомедиастинума, однако при развитии пневмоторакса рекомендуется рассмотрение варианта дренирования плевральных полостей [9].

**Цель работы** – анализ течения коронавирусной пневмонии у больных с пневмомедиастинумом.

## Методика

Было выполнено ретроспективное продольное нерандомизированное исследование данных историй болезни, результатов лечения, и особенностей госпитального периода. Анализировали результаты лечения

больных с коронавирусной пневмонией с СЭС в период с 08.05.2020 г. по 01.06.2021 г. Диагноз подтвержден при компьютерной томографии (КТ). Критерий включения в исследование: пациенты до 85 лет с коронавирусной пневмонией нуждающиеся в высокопоточной оксигенации или искусственной вентиляции легких (ИВЛ) с тяжелой дыхательной недостаточностью и поражением паренхимы легких (соответствует 3-4 степени тяжести по результатам КТ). Критерии исключения из исследования: лица старше 85 лет, наличие соматических заболеваний в состоянии декомпенсации, онкологических заболеваний, объемных образований в легких, отсутствие возможности получения информации об операциях у пациента. В общей сложности были проанализированы результаты лечения у 139 пациентов. В основную группу включен 71 пациент с коронавирусной пневмонией и пневмомедиастинумом находившиеся в клинике с 08.05.2020 г. по 01.06.2021 г., в группу сравнения – 68 пациентов с коронавирусной пневмонией без признаков СЭС.

Всем пациентам выполнялась КТ органов грудной клетки, а также ряд лабораторных исследований: клинический и биохимический анализ крови, коагулограмма, где особое внимание уделялось анализу крови на С-реактивный белок (СРБ), прокальцитонин (PCT) и подсчету лейкоцитарного индекса. У всех пациентов основной группы при обследовании по шкале mMRC выявлялась тяжелая степень одышки, по шкале Борга, оценивающей переносимость физической нагрузки до лечения, определена тяжелая степень одышки.

Учитывали наличие коморбидных состояний у исследуемых больных: Берлинские дефиниции использовались для постановки диагноза острого респираторного дистресс-синдрома, для выявления синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром) применяли шкалу International Society of Thrombosis and Haemostasis Scoring System (ISTH), острого почечного повреждения (ОПП) – критерии RIFLE. По шкале SOFA оценивали тяжесть состояния пациентов и прогноз. Оценка эффективности лечебных мероприятий проводили по динамике клинических симптомов, выраженность которых оценивалась на основании данных клинико-лабораторного обследования.

Пациентам, как основной группы, так и группы сравнения проводилось лечение по единому протоколу 14-й версии методических рекомендаций от 27.12.2021 г.

С помощью пакета «Statistica 10» проводили статистическую обработку полученных нами результатов. Для оценки соответствия анализируемых параметров закону нормального распределения использовали

критерии Шапиро-Уилки и Колмогорова-Смирнова. Количественные признаки, которые соответствовали нормальному распределению, представляли в виде: (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение). Данные, которые не соответствовали нормальному распределению, были представлены в виде: медианы [интерквартильного размаха]. С помощью параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манн-Уитни выполняли оценку статистической значимости различий между группами. Описание качественных признаков производили в виде относительных частот и отражали в процентах. Для сравнения групп по вариации качественных признаков использовали критерий  $\chi^2$ . Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

В 1-й группе ( $n=71$ ) средний возраст пациентов составил  $58,5 \pm 8,7$ , во 2 ( $n=68$ ) –  $59,2 \pm 8,2$  статистически значимых различий среди исследуемых больных не выявлено. Большая часть больных представлена лицами мужского пола ( $n=110$ ), что от общего числа исследуемых больных составило 79,1%, женщин – 29 (20,9%) (табл. 1).

Всем больным был выполнен общий и биохимический анализ крови, коагулограмма. При исследовании гемостаза существенных изменений параметров в группах не отмечено. При проведении биохимического исследования на 7-е сут уровень С-реактивного белка (СРБ) был статистически значимо выше в основной группе ( $n=71$ ) и составил  $130 \pm 11,9$ , в группе сравнения ( $n=68$ ) составил  $97 \pm 12,6$  ( $p < 0,001$ ) (рис. 1).

На 7-е сут уровень прокальцитонина (PCT) также был статистически значимо выше в основной группе и составлял  $2,7 \pm 0,03$ , тогда как в группе сравнения –  $0,068 \pm 0,05$  ( $p < 0,001$ ). В общем анализе крови в основной группе наблюдалась лимфоцитопения ( $2,0 \pm 0,6$ ), в группе сравнения –  $15,2 \pm 2,3$  ( $p < 0,001$ ).

Степень одышки в группах оценивали при поступлении по шкале mMRC и по шкале Борга. До лечения в основной группе ( $n=71$ ) у больных с пневмомедиастинумом показатели по шкале mMRC  $3,2 \pm 0,19$  и Борга  $4,5 \pm 0,29$  были статистически значимо выше ( $p < 0,001$ ), что соответствовало тяжелой степени одышки. Также нами при поступлении оценивалось состояние больных с использованием шкалы SOFA (табл. 1, рис. 2).

Распределение пациентов по встречаемости сопутствующей патологии, представлено в таблице 2. По частоте сопутствующих заболеваний статистически значимых различий не выявлено.

ИВЛ потребовалась всем пациентам основной группы. Средняя длительность процедуры составила  $18,2 \pm 6,5$  сут (табл. 3).

У 5 пациентов основной группы ( $n=71$ ) ИВЛ продолжалась более 3 нед, ОРДС развился у 29 больных основной группы и у 3 больных в группе сравнения ( $n=68$ ). В основной группе, представленной больными коронавирусной пневмонией и спонтанным пневмомедиастинумом в ОРИТ скончались 58 человек (81,7%), в группе сравнения, в которую вошли обследуемые с вирусной пневмонией без признаков СЭС скончались 2 человека (2,9%) ( $p < 0,001$ ).

двуемые с вирусной пневмонией без признаков СЭС скончались 2 человека (2,9%) ( $p < 0,001$ ).

### Обсуждение

В начале нового тысячелетия мировое сообщество впервые столкнулось с проблемой спонтанного пневмомедиастинума, вызванного коронавирусом SARS CoV2 [10]. На пике пандемии характер течения новой коронавирусной инфекции COVID-19 не позволил объективно оценивать частоту СЭС, однако актуальность тактики

Таблица 1/ Table 1

### Характеристика групп больных

#### Characteristics of patient groups

Показатели / Indicators	Основная группа / Main group ( $n=71$ ) /	Группа сравнения / reference group, ( $n=68$ )	Уровень значимости $p$ / Significance level $P$
Пол, м/ж / male and female gender	56/15	54/14	0,938
Возраст / Age	$58,5 \pm 8,7$	$59,2 \pm 8,2$	0,625
Шкала mMRC, до лечения / Modified medical research council (mMRC), before treatment	3[3;4]	2[2;3]	<0,001
Модифицированная Шкала Борга, до лечения / Modified Borg Dyspnea Scale, before treatment	4[3;5]	2[2;3]	<0,001
Исходная SOFA балл / pre-treatment SOFA, score	4[3;4]	2[2;3]	<0,001



Рис. 1. Уровень СРБ в группах.

Fig. 1. CRP levels in groups.

ведения больных с пневмомедиастинумом и вирусной пневмонией подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями по всему миру, описанными уже в первой половине 2020 г. [3, 11].

В работе С. Zhou и соавт. опубликованной в марте 2020 г. представлен клинический случай течения коронавирусной пневмонии с последующим развитием спонтанного пневмомедиастинума. Выявление СЭС яв-

лялось причиной прекращения введения глюкокортикоидов у данного больного [12]. Позднее (в мае 2020 г.), был описан еще один случай пневмомедиастинума, где впервые подробно раскрывались особенности патогенеза, а также указывались возможные предикторы данного состояния. Авторы указывали на длительное курение, ингаляцию лекарственных средств, выраженные кашлевые приступы, и напряженную физическую ак-

Таблица 2/ Table 2

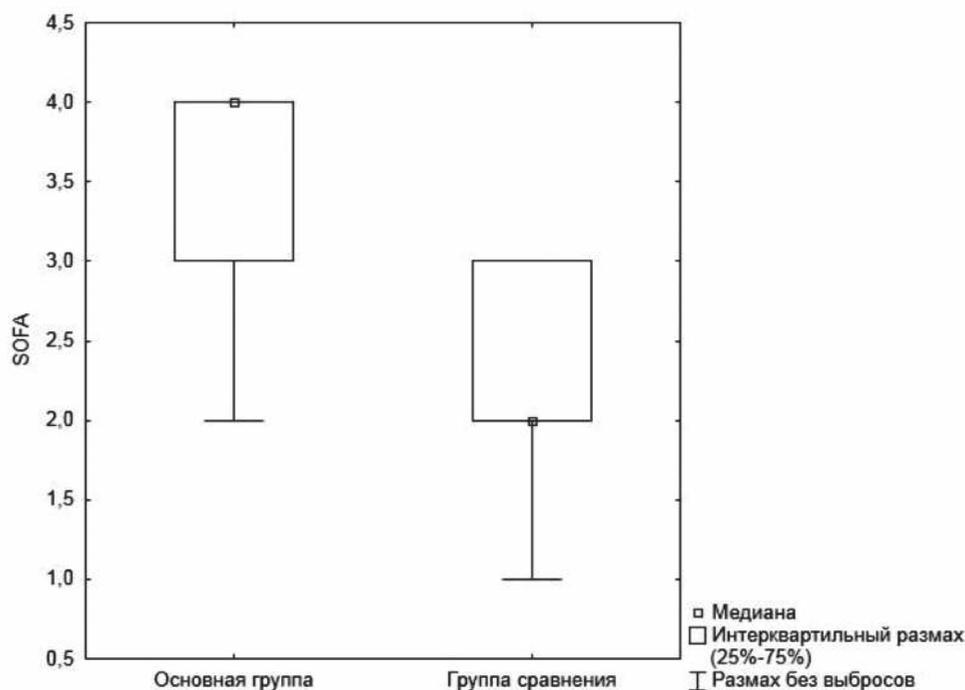
**Сопутствующие заболевания в группах исследования**

**Co-morbidities in patients in the study groups**

Показатель / Indicates	Основная группа / Main group (n=71)	Группа сравнения / reference group (n=68)	p-уровень значимости/ Significance level, P
Ожирение, абс. (%) / Obesity, abs. (%)	56 (79%)	52 (76%)	p=0,734
Сахарный диабет 2-го типа, абс. (%) / Type 2 diabetes, abs. (%)	31 (44%)	34 (50%)	p=0,405
Заболевания дыхательной системы, абс. (%) / Respiratory system diseases, abs. (%)	26 (37%)	29 (43%)	p=0,468
Сердечно-сосудистые заболевания, абс. (%) / cardiovascular disease, abs. (%)	59 (83%)	54 (79%)	p=0,578

**Примечание.** Абс. — абсолютное число обследуемых больных.

**Note.** Abs. — abs. number of patients under study.



**Рис. 2.** Оценка больных в группах по шкале SOFA.

**Fig. 2.** Evaluation of patients in groups according to the SOFA scale.

**Сравнительная клиническая характеристика исследуемых больных**  
**Comparative clinical characteristics of under study patients**

Показатели / Indicater	Основная группа / Main group, (n=71)	Группа сравнения / reference group (n=68)	Уровень значи- мости, p / Significance level, P
Продолжительность ИВЛ, сутки /Ventilator duration, day	18,2±6,5	9,3±1,7	<0,001
pO <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> , на 7-е сут в отделениях реанимации и интенсивной терапии / O <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> , on day 7th day in intensive care units	272±58	347±42	<0,001
ОРДС синдром, n-abc (%) / acute respiratory distress syndrome, n-abc(%)	29 (41%)	3 (4%)	<0,001
ДВС, n-abc (%) / Disseminated intravascular blood coagulation, n-abc(%)	6 (8%)	0 (0%)	<0,015
Полиорганная недостаточность, n-abc (%) / multiorgan failure, n-abc(%)	16 (23%)	2 (3%)	<0,001

тивность, как на значимые факторы в развитии данного специфического осложнения [13]. Уже ко второй половине 2020 г. были опубликованы научные работы, включавшие в себя серию клинических примеров развития СЭС на фоне пневмонии, вызванной SARS CoV2 [14].

В настоящее время накоплен значительный опыт наблюдения за данной категорией больных. Однако, до сих пор отсутствует единый системный подход в отношении клинической картины и лабораторных данных характеризующих пневмомедиастинум, что затрудняет, как проведение аналитических исследований, так и интерпретацию клинических данных. Например, в исследовании Nobre Pereira M. и соавт. описывается краткий анамнез болезни, перечислены основные лекарственные средства [15], а из лабораторных показателей выделяют лишь С-реактивный белок [16; 17].

Полученные нами данные указывают на то, что несмотря на сопоставимость групп по полу и возрасту, наличие сопутствующих заболеваний, исходная степень одышки в основной группе у больных со спонтанным пневмомедиастинумом, оцениваемая по шкале mMRC медиана была статистически значимо выше ( $p < 0,001$ ) и составляла 3 [3;4] балла. В группе сравнения аналогичный показатель, на момент поступления соответствовал средней степени одышки с медианой 2[2;3] балла. По шкале Борга, на момент поступления в группе сравнения медиана составляла 2[2;3] балла, что также соответствовало средней степени одышки. В основной группе у больных с СЭС медиана составляла 4[3;5], что статистически значимо выше ( $p < 0,001$ ), и соответствовало тяжелой степени одышки.

Нами оценивалась формализованная балльная оценка тяжести состояния на основе шкалы SOFA с целью оценки прогноза исхода заболевания. У исследуе-

мых основной группы при наличии спонтанного пневмомедиастинума по шкале SOFA медиана была статистически значимо выше ( $p < 0,001$ ) и составляла 4[3;4] балла, тогда как в группе сравнения медиана аналогичного показателя составляла 2[2;3] балла. Для больных основной группы на фоне тяжелой пневмонии, вызванной новым коронавирусом COVID-19, были характерны исходно более выраженная гипоксемия и более частое развитие шока.

Анализ лабораторных показателей, выполненных на 7-е сут, показал, что уровень СРБ был статистически значимо выше в основной группе и составил  $130 \pm 11,9$ , тогда как в группе сравнения –  $97 \pm 12,6$  ( $p < 0,001$ ). При анализе РСТ на 7-е сут показатель также статистически значимо более высокий определялся в основной группе и составлял  $2,7 \pm 0,03$ , а в группе сравнения  $0,068 \pm 0,05$  ( $p < 0,001$ ). Также, в общем анализе крови в основной группе наблюдалась лимфоцитопения ( $p < 0,001$ ).

При проведении сравнительной клинической характеристики исследуемых больных были также обнаружены статистически значимые различия большинства показателей. Так, pO<sub>2</sub>/Fio<sub>2</sub>, на 7-е сут в ОРИТ был значимо ниже в основной группе и составил  $272 \pm 58$  ( $p < 0,001$ ). ОРДС развился у 29 больных основной группы и у 3 больных в группе сравнения ( $p < 0,001$ ). Полиорганная недостаточность значимо чаще развилась у больных с пневмомедиастинумом и составила 23% от общего числа исследуемых в группе ( $p < 0,001$ ). В основной группе, из 71 больного с коронавирусной пневмонией и спонтанным пневмомедиастинумом в ОРИТ скончались 58 (81,7%), в группе сравнения из 68 исследуемых с вирусной пневмонией без признаков СЭС скончались 2 (2,9%) ( $p < 0,001$ ).

### Выводы

Пневмомедиастинум является грозным осложнением пневмонии коронавирусной этиологии, что требует особого внимания у коморбидного пациента.

Развитие напряженного пневмомедиастинума и клинически значимого сопутствующего пневмоторакса может стать показанием к плевральному дренированию, и дренированию средостения в случае неэффективности медикаментозной терапии и нарастании СЭС.

У больных тяжелая пневмония, вызванная новым коронавирусом, COVID-19, при наличии пневмомедиастинума значимо чаще приводит к развитию ОРДС ( $p < 0,001$ ), полиорганной недостаточности ( $p < 0,001$ ) и вероятно, способна выступать предиктором негативного прогноза исхода заболевания.

### Литература

#### (п.п. 1-9; 11-15 см. References)

10. Абакумов М.М., Шамба Х.Л., Даниелян Ш.Н. Спонтанная эмфизема средостения. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2010; 2: 47–50.
16. Павликова Е.П., Агапов М.А., Малахов П.С., Галлямов Э.А., Есаков Ю.С., Маркар'ян Р. и др. Эмфизема средостения — специфическое осложнение COVID-19 (клиническое наблюдение). *Общая реаниматология*. 2021; 17 (2): 4–15.
17. Лестева Н.А., Адиева Е.В., Лесина С.С., Айбазова М.И., Абрамов К.Б., Себедев К.И. и др. Пневмомедиастинум на фоне коронавирусной пневмонии. *Клинические наблюдения. Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2021; 18(3): 23-9. DOI: 10.21292/2078-5658-2021-18-3-23-29

### References

1. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382: 727–33. PMID: 31978945 DOI: 10.1056/NEJMoa2001017
2. Chand S., Kapoor S., Orsi D., et al. COVID-19-Associated critical illness-report of the first 300 patients admitted to intensive care units at a New York City Medical Center. *J. Intens. Care Med*. 2020; 35(10): 963–70. doi: 10.1177/0885066620946692
3. Kolani S., Nawfal H., Haloua M., Lamrani Y.A., Boubbou M., Serraj M., et al. Spontaneous Pneumomediastinum Occurring in the SARS-COV-2 Infection. *ID Cases*. 2020; 21: e00806. PMID: 32395425 DOI: 10.1016/j.idcr.2020.e00806

#### Сведения об авторах:

Все авторы работают в ГБУЗ Краевая клиническая больница №2

**Кузнецов Ю.С.**, врач-хирург;

**Дурлештер В.М.**, доктор мед. наук, проф., зам. главного врача;

**Маркин В.В.**, врач-хирург;

**Мирицхулава Н.Г.**, зав. пульмонологическим отд-нием;

**Крячко А.А.**, канд. мед. наук, врач-хирург;

**Щупляк С.В.**, врач-хирург;

**Мурашко Д.С.**, канд. мед. наук, врач-хирург;

**Рудько В.А.**, врач-хирург ГБУЗ.

4. Wang J., Su X., Zhang T., Zheng C. Spontaneous Pneumomediastinum: A Probable Unusual Complication of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia. *Korean J Radiol*. 2020; 21(5): 627–8. PMID: 32323507 DOI: 3348/kjr.2020.0281
5. Macklin M.T., Macklin C.C. Malignant interstitial emphysema of the lungs and mediastinum as an important occult complication in many respiratory diseases and other conditions: interpretation of the clinical literature in the light of laboratory experiment. *Medicine*. 1944; 23(4): 281–358.
6. Sihoe A., Filosso P., Cusumano G., Lococo F., Melfi F. Pneumomediastinum and Pneumothorax in COVID-19 Patients. December 2020. DOI: 10.25373/ctsnet.13393064
7. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H., et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020; 8: 475–81 Published Online February 21, 2020 DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
8. World Health Organization. Clinical management of COVID-19. Interim guidance. 25 January 2021.
9. Sihoe A., Filosso P., Cusumano G., Lococo F., Melfi F. Pneumomediastinum and Pneumothorax in COVID-19 Patients. December 2020. DOI: 10.25373/ctsnet.13393064
10. Abakumov M.M., SHamba H.L., Danielyan SH.N. Spontannaya emfizema sredosteniya. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2010; 2: 47–50. (In Russian)
11. Wang W., Gao R., Zheng Y., Jiang L. COVID-19 With Spontaneous Pneumothorax, pneumomediastinum and Subcutaneous Emphysema. *J Travel Med*. 2020; taaa062. PMID: 32330274 DOI: 10.1093/jtm/taaa062. (In Russian)
12. Zhou C., Gao C., Xie Y., Xu M. COVID-19 With Spontaneous Pneumomediastinum. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20(4): 510. PMID: 32164830 DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30156-0
13. Mohan V., Tauseen R.A. Spontaneous Pneumomediastinum in COVID-19. *BMJ Case Rep*. 2020; 13(5): e236519. PMID: 32457032 DOI: 10.1136/bcr-2020-236519
14. Volpi S., Ali J.M., Suleman A., Ahmed R.N. Pneumomediastinum in COVID-19 patients: a case series of a rare complication. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2020; 58(3): 646–7. PMID: 32754730. DOI: 10.1093/ejcts/ezaa222
15. Pereira M.N., Blanco R., Areia V. Pneumomediastinum: an uncommon complication of COVID-19 pneumonia. *Arch Bronconeumol*. 2021; 57: 68. PMID: 33069462. DOI: 10.1016/j.arbres.2020.08.010
16. Pavlikova E. P., Agapov M.A., Malahov P.S., Gallyamov E.A., Esakov YU.S., Markar'yan D. R., et al. Emfizema sredosteniya — specificheskoe oslozhenie COVID-19 (klinicheskoe nablyudenie). *Obshchaya reanimatologiya*. 2021; 17(2): 4–15 (In Russian).
17. Lesteva N.A., Adieva E.V., Lesina S.S., Ajbazova M.I., Abramov K.B., Sebelev K.I., et al. Pnevnomediastinum na fone koronavirusnoj pnevmonii. *Klinicheskie nablyudeniya // Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2021; 18(3): 23-9. DOI: 10.21292/2078-5658-2021-18-3-23-29 (In Russian)

## ОБЗОРЫ

© Быков Ю.В., 2023

УДК 616.43

**Быков Ю.В.**

### Дисфункция мелатонинергической системы в патогенезе сахарного диабета

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России,

355017, Ставрополь, ул. Мира, д. 310;

ГБУЗ ГК «Детская городская клиническая больница им. Г.К. Филиппского»,

355002, Ставрополь, ул. Пономарева, д. 5

Сахарный диабет (СД) – распространенная эндокринопатия с высоким риском летальности и большим количеством осложнений. Патогенез данного заболевания остается до конца не изученным и является актуальным направлением современной эндокринологии. Дисфункция мелатонинергической системы рассматривается как один из возможных патофизиологических механизмов при СД. Мелатонин (МТ) – фундаментальный гормон этой системы, имеет большое физиологическое значение для организма, за счет регуляции многих функций: циркадных ритмов, нейроэндокринной системы, церебральной активности и др. Эффекты МТ опосредуются через МТ<sub>1</sub> и МТ<sub>2</sub> рецепторы, которые локализуются по всему организму, в том числе и в поджелудочной железе. МТ обладает выраженными антиоксидантными свойствами, в то время как оксидативный стресс может быть триггером развития СД и его осложнений. МТ играет важную роль в регуляции энергетического обмена и гомеостаза глюкозы, уровни этого гормона снижены у пациентов с СД. Генетические нарушения в мелатониновых рецепторах МТ<sub>1</sub> и МТ<sub>2</sub> могут являться причиной нарушения выработки инсулина и быть причиной развития СД. Диагностика дисфункции мелатонинергической системы, за счет выявления нарушений циркадной ритмики и выработки МТ, может являться важным профилактическим шагом при данной эндокринопатии.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; мелатонинергическая система; мелатонин

**Для цитирования:** Быков Ю.В. Дисфункция мелатонинергической системы в патогенезе сахарного диабета. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 73-78.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.73-78

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

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 27.01.2023

Принята в печать 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

**Bykov Yu.V.**

### Dysfunction of the melatonergic system in the pathogenesis of diabetes mellitus

Stavropol State Medical University,

Mira St. 310, Stavropol, 355017, Russian Federation;

Filippsky Children's City Clinical Hospital,

Ponomareva St. 5, Stavropol, 355002, Russian Federation

Diabetes mellitus (DM) is a widespread endocrine disorder with a high risk of death and numerous complications. The pathogenesis of DM has not been fully elucidated, and it is an important research topic in endocrinology. Melatonergic system dysfunction is considered a possible pathophysiological mechanism in DM. Melatonin (MT), the main hormone of this system, plays a very important physiological role by regulating numerous functions, including circadian rhythms, neuroendocrine system, and cerebral activity. MT's effects are mediated by the MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors that are found in all parts of the body, including the pancreas. MT has strong antioxidant activity, which is relevant for DM since oxidative stress can trigger DM and its complications. MT plays an important role in the regulation of energy metabolism and maintenance of plasma glucose. MT concentration is decreased in DM patients. Genetic defects affecting the melatonin receptors, MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub>, may disrupt insulin production and provoke the development of DM. Diagnosis of melatonergic system dysfunction by detecting disorders of circadian rhythm and MT production may help taking timely prophylactic measures in DM.

**Keywords:** diabetes mellitus; melatonergic system; melatonin

**For citation:** Bykov Yu.V. Dysfunction of the melatonergic system in the pathogenesis of diabetes mellitus *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 73-78. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.73-78

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

**Information about the author:**

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

**Financing.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Received 27.01.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

## Введение

Сахарный диабет (СД) является хроническим нарушением обмена веществ с растущей глобальной распространенностью, приближающейся к масштабам эпидемии [1-3]. СД – это эндокринопатия, характеризуется гипергликемией, вызванной либо резистентностью к инсулину, либо снижением его секреции [3, 4]. По данным на 2017 г. у 8,9% взрослых в возрасте 18 лет и старше был диагностирован СД, а на долю этого заболевания пришлось около 1,6 млн смертей [2]. По прогнозам к 2035 г., СД будут болеть около 592 млн человек, что станет седьмой по значимости причиной смерти среди всех нозологических единиц [2, 3, 5].

СД представляет собой сложную гетерогенную группу заболеваний, характеризующихся гипергликемией, включающую СД 1-го и 2-го типа, гестационный СД и другие специфические типы СД [6]. Аутоиммунное поражение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы (ПЖ) индуцирует развитие СД 1-го типа, а выраженная инсулинорезистентность на фоне неадекватного компенсаторного инсулиносекреторного ответа вследствие дисфункции  $\beta$ -клеток ПЖ, приводит к СД 2-го типа [1, 6]. Среди пациентов СД наиболее часто встречается именно СД 2-го типа, на который приходится примерно 90% взрослых пациентов [1]. СД может вызывать различные осложнения: диабетическую невропатию, ретинопатию, нефропатию и др, которые могут быть основными причинами тяжести течения и летальности при данном заболевании [3, 4].

Патофизиология СД остается до конца не изученной и поиск новых патогенетических причин этого заболевания, является актуальной проблемой современной эндокринологии [3, 7]. Доказательства, демонстрирующие важность нарушения циркадных ритмов (ЦР) в развитии СД [8-11], отражают актуальность влияния мелатонина (МТ) и его рецепторов на этиологию и патогенез данного заболевания [2]. Целью данного обзора

являлся анализ современной научной литературы по вопросу вовлеченности нарушения мелатонинергической системы в патогенез СД.

**Мелатонинергическая система: общая характеристика.** Мелатонинергическая система регулирует множество важнейших физиологических процессов, что позволяет ей быть неотъемлемым патофизиологическим аспектом большинства заболеваний [12, 13]. Физиология мелатонинергической передачи сигналов выяснена лишь частично, но четко доказано, что основным компонентом этой системы является гормон эпифиза – МТ [14]. МТ оказывает основное действие на фазовый сдвиг, который отражает петлю обратной связи между шишковидной железой (ШЖ) и эндогенным циркадным водителем ритма – супрахиазменными ядрами гипоталамуса (СХЯ) [14].

**Мелатонин как основа мелатонинергической системы и его рецепторы.** МТ представляет собой индоламин, синтезируемый из триптофана, который в основном секретируется ШЖ [2, 15-18]. ШЖ является ритмическим синхронизатором, соединяющим нервную и эндокринную системы и главным источником синтеза МТ [19]. МТ также продуцируется некоторыми «внешишковидными» тканями и клетками: сетчаткой, ПЖ, кожей, яичниками, плацентой и др. [16, 20-22]. Секреция МТ регулируется центральными циркадными часами, находящимися в СХЯ, а также зависит от колебаний продолжительности светового дня: продукция МТ резко подавляется воздействием света, при этом повышенная секреция происходит ночью [2, 9, 15, 19,].

У человека были идентифицированы 2 основных мелатониновых рецептора, связанных с G-белком – МТ<sub>1</sub> (высокая аффинность) и МТ<sub>2</sub> (низкая аффинность), которые кодируются генами *MTNR1A* и *MTNR1B*, соответственно [9, 15, 17, 19, 23, 24]. Рецепторы

MT<sub>1</sub> и MT<sub>2</sub> в основном локализованы в СХЯ и в нескольких областях ЦНС, включая кору головного мозга и мозжечка, а также средний мозг [25]. Идентифицирован и третий член семейства мелатониновых рецепторов — GPR50, который демонстрирует высокую гомологию последовательностей с MT<sub>1</sub> и MT<sub>2</sub> [26]. Рецепторы MT<sub>1</sub> и MT<sub>2</sub> экспрессируются по всему организму, где они регулируют ЦР, сон, артериальное давление и репродуктивные функции [27]. Известно, что MT также модулирует ритмичную секрецию инсулина через рецепторы MT<sub>1</sub> и MT<sub>2</sub> [9, 15, 28], которые обильно экспрессируются в островках ПЖ [7].

**Основные функции мелатонина с позиций патогенеза сахарного диабета.** MT преодолевает все физиологические барьеры и оказывает важное регулирующее воздействие на многочисленные биологические и поведенческие процессы [2, 9, 15, 26]. MT выполняет несколько важных физиологических функций, таких как: поддержание гомеостаза организма, модуляция ЦР, контроль нейроэндокринной оси, антиоксидантное действие, регуляция репродуктивной системы и др. [29, 30]. В первую очередь MT является ключевым регулятором гомеостаза ЦР у людей, что имеет важное значение практически для всех системных физиологических процессов [1, 16, 19]. MT играет ключевую роль в замедлении старения, развитии онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, СД и его осложнений [3, 16, 31, 32]. MT выполняет важную функцию в нейрогенезе и нейропротекции [2]. Прямое действие MT на головной мозг снижает симпатический тонус и подавляет активность надпочечников [24]. MT также регулирует гемодинамическое равновесие: эти механизмы активируются мелатониновыми рецепторами сердечно-сосудистой системы [33].

MT обладает сильным антиоксидантным действием [9, 17, 21, 34, 35]. Этот факт особенно важен, с учетом того, что в последние годы именно оксидативный стресс (ОС) рассматривается как ключевое звено в патофизиологии СД и его осложнений [36, 37]. MT значительно снижает выработку активных форм кислорода и предотвращает развитие ОС, уменьшая перекисное окисление липидов [21, 38, 39]. MT связан с различными сигнальными антиоксидантными механизмами, включая пути ERK и MAPK, а также стимулирование сигнального пути SIRT1/Nrf2, за счет чего уменьшается образование активных форм кислорода, индуцированное липополисахаридами [40, 41]. Более того, MT ослабляет ОС посредством модуляции пути Akt/NFκB [42]. ОС на фоне СД, играет заметную роль в возникновении диабетических осложнений, которые, вероятно, можно облегчить с помощью антиоксидантного действия MT [43].

MT вырабатывается во всех клетках животных, имеющих митохондрии, а защитная функция митохондрий имеет решающее значение для цитопротекции и антиапоптотических эффектов, в том числе и в патофизиологии СД [44]. Иммуномодуляция MT включает противовоспалительные эффекты, что приводит к увеличению продукции противовоспалительных цитокинов и снижению уровня провоспалительных цитокинов, что является важным фактором, в силу того, что в патогенезе СД рассматривается и воспалительная теория [45]. MT также обладает выраженной антиэксцитотоксической активностью, а сама эксцитотоксичность является частым проявлением при СД [17].

**Дисфункция мелатонинергической системы при СД. Мелатониновые рецепторы, поджелудочная железа и сахарный диабет.** Давно показано, что MT играет важную роль в регуляции энергетического обмена и гомеостаза глюкозы [46]. Оптимальные уровни MT необходимы для нормального углеводного обмена, в то время как сверхфизиологический, так и низкий уровень эндогенного MT могут оказывать негативное влияние на метаболизм глюкозы [9, 15, 47]. Известно, что ночная секреция MT способствует дневной чувствительности к инсулину и сохранению функции β-клеток ПЖ [48], а низкая секреция MT связана с более высоким риском развития СД [46].

MT осуществляет влияние на секрецию инсулина, углеводный обмен и уровень глюкозы в крови через свои рецепторы в ПЖ, печени и жировой ткани [3, 47]. Доказано, что MT ингибирует секрецию инсулина β-клетками ПЖ посредством его взаимодействия с рецепторами MT<sub>1</sub> и/или MT<sub>2</sub> [2]. MT снижает секрецию инсулина посредством ингибирования путей цАМФ и цГМФ [15, 28]. MT также снижает секрецию инсулина за счет высвобождения инозитолтрифосфата, опосредованного через MT<sub>2</sub> рецепторы [47]. MT может модулировать реакцию инсулина на глюкагоноподобный пептид 1, глюконеогенез в почечных канальцах и чувствительность печени к инсулину [9]. MT модулирует активность фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) — протеинкиназы B, за счет чего у этого гормона имеется способность ингибировать глюконеогенез в печени и стимулировать поглощение глюкозы клетками скелетных мышц [27]. Через свои рецепторы MT может регулировать экспрессию GLUT4 и инициировать фосфорилирование рецептора инсулина и его внутриклеточных субстратов, активизируя сигнальный путь инсулина [49].

Идентификация гена MTNR1B, кодирующего белок рецептора MT<sub>2</sub>, как важного диабетического гена, связанного с дисфункцией β-клеток ПЖ, дала огромный импульс исследованиям, сфокусированным на ассоциациях между передачей сигналов гормонов ШЖ

и полиморфизмом мелатониновых рецепторов [9]. Полиморфный вариант MTNR1B увеличивает скорость прогрессирования от нормального уровня глюкозы до нарушенного уровня глюкозы натощак, что может провоцировать СД 2-го типа [7, 9, 46]. Недавние исследования с использованием экспериментальных моделей показали, что у мышей генетическая абляция MT<sub>1</sub> или MT<sub>2</sub> влияет на метаболизм глюкозы [27].

Исследования пинеалэктомии на животных показали, что снижение уровня МТ вызывает непереносимость глюкозы и резистентность к инсулину [27]. Сильная корреляция между секрецией МТ и инсулина в ночное время была описана у пациентов с метаболическим синдромом [9]. Другие исследования обнаружили связь между секрецией МТ и последующим развитием СД 2-го типа [9]. МТ может влиять на гликемический контроль у пациентов с СД 2-го типа [50]. СД сопровождается более низкими концентрациями МТ в сыворотке крови [3, 49].

Доказательства, свидетельствующие о способности МТ уменьшать развитие СД, были получены из наблюдений, что измененный метаболизм глюкозы и резистентность к инсулину у рабочих работающих в ночную смену, связаны с низким уровнем МТ в крови [49]. Снижение выработки МТ, как у пожилых людей, так и у людей с хроническими метаболическими заболеваниями, вызывает резистентность к инсулину, непереносимость глюкозы, нарушение сна и метаболическую циркадную дезорганизацию, ведущую к возникновению СД [49].

### Заключение

СД является тяжелым, хроническим эндокринным заболеванием, патогенез которого, полностью до сих пор не ясен. Дисфункция мелатонинергической системы может рассматриваться как важное звено в патофизиологии данного заболевания. Нарушение ЦР и выработки МТ на фоне СД, может являться важным диагностическим критерием при этой эндокринопатии. Своевременная оценка циркадного статуса и уровня МТ, может иметь важное профилактическое значение для снижения риска развития СД и его осложнений. МТ, как мощный антиоксидантный агент, может рассматриваться в качестве дополнительного терапевтического средства при СД.

### Литература

(п.п. 1-9; 12-35; 38-50 см. References)

10. Быков Ю.В., Батурин В.А. Нарушение хода биологических часов у подростков с сахарным диабетом 1 типа в стадии ремиссии. *Забайкальский медицинский вестник*. 2022; 4: 19-26. [https://doi.org/10.52485/19986173\\_2022\\_4\\_19](https://doi.org/10.52485/19986173_2022_4_19)
11. Быков Ю.В., Батурин В.А. Нарушение адаптационных возможностей у детей с инсулинозависимым сахарным диабетом на основе методики временных отрезков. *Вестник современной клинической медицины*. 2021; 5(14): 112-6. [https://doi.org/10.20969/VSKM.2021.14\(5\).112-116](https://doi.org/10.20969/VSKM.2021.14(5).112-116)
36. Быков Ю.В., Батурин В.А. Роль оксидативного стресса в патофизиологии сахарного диабета 1-го типа. *Патогенез*. 2022 (6); 20(4): 35-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.25557/2310-0435.2022.04.35-39>
37. Быков Ю.В. Роль оксидативного стресса в развитии осложненный при сахарном диабете. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022; 3: 322-7. DOI: 10.14300/mnnc. 2022.17080
1. Huang K., Luo X., Zhong Y., Deng L., Feng J. New insights into the role of melatonin in diabetic cardiomyopathy. *Pharmacol Res Perspect*. 2022; 10(1): e00904. <https://doi.org/10.1002/prp2.904>
2. Onaolapo A.Y., Onaolapo O.J. Circadian dysrhythmia-linked diabetes mellitus: Examining melatonin's roles in prophylaxis and management. *World J Diabetes*. 2018; 9(7): 99-114. <https://doi.org/10.4239/wjd.v9.i7.99>
3. Pourhanifeh M.H., Hosseinzadeh A., Dehdashtian E., Hemati K., Mehrzadi S. Melatonin: new insights on its therapeutic properties in diabetic complications. *Diabetol Metab Syndr*. 2020; 12: 30. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00537-z>
4. Armandeh M., Bameri B., Haghi-Aminjan H., Foroumadi R., Ataie M., Hassani S., et al. A systematic review on the role of melatonin and its mechanisms on diabetes-related reproductive impairment in non-clinical studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 1022989. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1022989>
5. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14(2): 88-98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
6. American Diabetes Association 2 Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021; 44: S15-S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
7. Shen L.L., Jin Y. Effects of MTNR1B genetic variants on the risk of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Mol Genet Genomic Med*. 2019; 7(5): 611. <https://doi.org/10.1002/mgg3.611>
8. James S.M., Honn K.A., Gaddameedhi S., Van Dongen H.P.A. Shift Work: Disrupted Circadian Rhythms and Sleep-Implications for Health and Well-Being. *Curr. Sleep Med. Rep*. 2017; 3: 104-12. <https://doi.org/10.1007/s40675-017-0071-6>
9. Nikolaev G., Robeva R., Konakchieva R. Membrane Melatonin Receptors Activated Cell Signaling in Physiology and Disease. *Int J Mol Sci*. 2021; 23(1): 471. <https://doi.org/10.3390/ijms23010471>
10. Bykov Yu. V., Baturin V.A. Violation of the biological clock in adolescents with type 1 diabetes mellitus in remission. *Zabaykal'ski meditsinskiy vestnik*. 2022 (a): 4; 19-26. (In Russian) [https://doi.org/10.52485/19986173\\_2022\\_4\\_19](https://doi.org/10.52485/19986173_2022_4_19)
11. Bykov Yu.V., Baturin V.A. Violation of adaptive capabilities in children with insulin-dependent diabetes mellitus based on the method of time intervals. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2021; 5(14): 112-6. (In Russian) [https://doi.org/10.20969/VSKM.2021.14\(5\).112-116](https://doi.org/10.20969/VSKM.2021.14(5).112-116)
12. Ivanov D.O., Evsyukova I.I., Mazzocchi G., Anderson G., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M., et al. The Role of Prenatal Mel-

### References

- atonin in the Regulation of Childhood Obesity. *Biology (Basel)*. 2020; 9(4): 72. <https://doi.org/10.3390/biology9040072>
13. Karamitri A., Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15(2): 105-25. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0130-1>
  14. De Berardis D., Marini S., Fornaro M., Srinivasan V., Iasevoli F., Tomasetti C., et al. The melatonergic system in mood and anxiety disorders and the role of agomelatine: implications for clinical practice. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(6): 12458-83. <https://doi.org/10.3390/ijms140612458>
  15. Wajid F., Poolacherla R., Mim F.K., Bangash A., Rutkofsky I.H. Therapeutic potential of melatonin as a chronobiotic and cytoprotective agent in diabetes mellitus. *J Diabetes Metab Disord*. 2020; 19(2): 1797-825. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00585-2>
  16. Mazzoccoli G., Kvetnoy I., Mironova E., Yablonskiy P., Sokolovich E., Krylova J., et al. The melatonergic pathway and its interactions in modulating respiratory system disorders. *Biomed Pharmacother*. 2021; 137: 111397. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111397>
  17. Pérez-Lloret S., Cardinali D.P. Melatonin as a Chronobiotic and Cytoprotective Agent in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 650597. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.650597>
  18. Szewczyk P.B., Dziuba A.M., Poniewierka E. Melatonin—metabolism and the role of pineal hormone. *Pielęgniarstwo i Zdrowie Publiczne Nursing and Public Health*. 2018; 8(2): 135-9.
  19. Otamas A., Grant P.J., Ajjan R.A. Diabetes and atherothrombosis: The circadian rhythm and role of melatonin in vascular protection. *Diab Vasc Dis Res*. 2020; 17(3): 1479164120920582. <https://doi.org/10.1177/1479164120920582>
  20. Mahmood D. Pleiotropic effects of Melatonin. *Drug research*. 2019; 69(02): 65-74. <https://doi.org/10.1055/a-0656-6643>
  21. Luo Q., Cai Y., Zhao Q., Jiang Y., Tian L., Liu Y., et al. Renal Protective Effects of Melatonin in Animal Models of Diabetes Mellitus-Related Kidney Damage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res*. 2022; 2022: 3770417. <https://doi.org/10.1155/2022/3770417>
  22. Amaral F.G.D., Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab*. 2018; 62(4): 472-9. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>
  23. Yapıslar H., Haciosmanoglu E., Sarioglu T., Ekmekcioglu C. The melatonin MT<sub>2</sub> receptor is involved in the anti-apoptotic effects of melatonin in rats with type 2 diabetes mellitus. *Tissue & Cell*. 2022; 76: 101763. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101763>
  24. Afsar B., Elsurer Afsar R., Sag A.A., Kanbay A., Korkmaz H., Cipolla-Neto J., et al. Sweet dreams: therapeutic insights, targeting imaging and physiologic evidence linking sleep, melatonin and diabetic nephropathy. *Clin Kidney J*. 2020; 13(4): 522-30. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz198>
  25. Ng K.Y., Leong M.K., Liang H., Paxinos G. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct. Funct*. 2017; 222: 2921-39. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1439-6>
  26. Cecon E., Oishi A., Jockers R. Melatonin Receptors: Molecular Pharmacology and Signalling in the Context of System Bias. *Br. J. Pharm*. 2018; 175: 3263-80. <https://doi.org/10.1111/bph.13950>
  27. Owino S., Buonfiglio D.D.C., Tchic C., Tosini G. Melatonin Signaling a Key Regulator of Glucose Homeostasis and Energy Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 488. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00488>
  28. Zibolka J., Bazwinsky-Wutschke I., Mühlbauer E., Peschke E. Distribution and Density of Melatonin Receptors in Human Main Pancreatic Islet Cell Types. *J. Pineal Res*. 2018; 65: 12480. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
  29. Farhood B., Mortezaee K., Haghi-Aminjan H., Khanlarkhani N., Salehi E., Nashtaei M.S., et al. A systematic review of radiation-induced testicular toxicities following radiotherapy for prostate cancer. *J Cell Physiol*. 2019; 234(9): 14828-37. <https://doi.org/10.1002/jcp.28283>
  30. Tarocco A., Caroccia N., Morciano G., Wieckowski M.R., Ancora G., Garani G., et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis*. 2019; 10(4): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>
  31. Reiter R.J., Rosales-Corral S., Tan D.X., Jou M.J., Galano A., Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cel. Mol. Life Sci*. 2017; 74: 3863-81. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7>
  32. Mok J.X., Ooi J.H., Ng K.Y., Koh R.Y., Chye S.M. A new prospective on the role of melatonin in diabetes and its complications. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2019; 40(1). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0036>
  33. Baltatu O.C., Amaral F.G., Campos L.A., Cipolla-Neto J. Melatonin, mitochondria and hypertension. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74: 3955-64. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2613-y>
  34. Winiarska K., Dzik J.M., Labudda M., Focht D., Sierakowski B., Owczarek A., et al. Melatonin nephroprotective action in Zucker diabetic fatty rats involves its inhibitory effect on NADPH oxidase. *Journal of Pineal Research*. 2016; 60(1): 109-17. <https://doi.org/10.1111/jpi.12296>
  35. Mirza-Aghazadeh-Attari M., Mohammadzadeh A., Mostavafi S., Mihanfar A., Ghazizadeh S., Sadighparvar S., et al. Melatonin: an important anticancer agent in colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2020; 235(2): 804-17. <https://doi.org/10.1002/jcp.29049>
  36. Bykov Yu.V., Baturin V.A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of type 1 diabetes mellitus. *Patogenez*. 2022 (6); 20(4): 35-9. (In Russian) <https://doi.org/https://doi.org/10.25557/2310-0435.2022.04.35-39>
  37. Bykov Yu.V. The role of oxidative stress in the development of complications in diabetes mellitus. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2022; 3: 322-7. (In Russian) <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17080>
  38. Dehdashtian E., Mehrzadi S., Yousefi B., Hosseinzadeh A., Reiter R.J., Safa M., et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. *Life Sci*. 2018; 193: 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.001>
  39. Maiocchi S.L., Morris J.C., Rees M.D., Thomas S.R. Regulation of the nitric oxide oxidase activity of myeloperoxidase by pharmacological agents. *Biochem Pharmacol*. 2017; 135: 90-115. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.016>
  40. Ren W., Liu G., Chen S., Yin J., Wang J., Tan B., et al. Melatonin signaling in T cells: functions and applications. *J. Pineal Res*. 2017; 62(3) <https://doi.org/10.1111/jpi.12394>. 10.1111/jpi.12394
  41. Sung J.Y., Bae J.H., Lee J.H., Kim Y.N., Kim D.K. The melatonin signaling pathway in a long-term memory in vitro study. *Molecules*. 2018; 23(4): 737. <https://doi.org/10.3390/molecules23040737>
  42. Moniruzzaman M., Ghosal I., Das D., Chakraborty S.B. Melatonin ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress through modula-

- tion of Erk/Akt/NFkB pathway. *Biol. Res.* 2018; 51(1): 17. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0168-5>
43. Nobakht-Haghighi N., Rahimifard M., Baeeri M., Rezvanfar M.A., Moini Nodeh S., Haghi-Aminjan H., et al. Regulation of aging and oxidative stress pathways in aged pancreatic islets using alpha-lipoic acid. *Mol Cell Biochem.* 2018; 449(1-2): 267–76. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3363-3>
44. Tan D.X., Reiter R. J. Mitochondria: the birth place, battle ground and the site of melatonin metabolism in cells. *Melatonin Res.* 2019; 2: 44–66. <https://doi.org/10.32794/mr11250011>
45. Hardeland R. Melatonin and inflammation—story of a double-edged blade. *J. Pineal Res.* 2018; 65: 12525. <https://doi.org/10.1111/jpi.12525>
46. Arendt J., Aulinas A. Physiology of the Pineal Gland and Melatonin. Endotext [Internet]. *South Dartmouth (MA)*. 2022. PMID: 31841296
47. Mulder H. Melatonin Signalling and Type 2 Diabetes Risk: Too Little, Too Much or Just Right? *Diabetologia.* 2017; 60: 826–9. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4249-8>
48. Costes S., Boss M., Thomas A.P., Matveyenko A.V. Activation of Melatonin Signaling Promotes beta-Cell Survival and Function. *Mol Endocrinol.* 2015; 29(5): 682–92. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1293>
49. El-Missiry M.A., El-Missiry Z.M.A., Othman A.I. Melatonin is a potential adjuvant to improve clinical outcomes in individuals with obesity and diabetes with coexistence of Covid-19. *Eur J Pharmacol.* 2020; 882: 173329. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173329>
50. Reutrakul S., Siwasaranond N., Nimitphong H., Saetung S., Chirakalwasan N., Chailurkit L.O., et al. Associations between Nocturnal Urinary 6-Sulfatoxymelatonin, Obstructive Sleep Apnea Severity and Glycemic Control in Type 2 Diabetes. *Chronobiol. Int.* 2017; 34: 382–92. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1278382>

**Сведения об авторе:**

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

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Московцев А.А.<sup>1,2,3</sup>, Зайченко Д.М.<sup>1,3,4</sup>, Иванов П.К.<sup>3</sup>, Солопова О.Н.<sup>3</sup>

## Клеточный стресс, старение и канцерогенез

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,  
125993, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
115478, Москва, Россия, Каширское ш., д. 24, корп. 2;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»,  
117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 10, корп. 2

Соматические мутации, которые придают селективное преимущество в росте соматическим клеткам, считаются ключевым фактором в развитии спорадических опухолей. Исследования канцерогенного соматического мутагенеза, причиной которого могут быть как прямые повреждения ДНК и репарация, так и ошибки во время репликации ДНК, затруднены из-за большого числа сопутствующих «нераковых» мутаций. Геномные данные указывают на присутствие в нормальных тканях значительного числа клеток-носителей критических онкогенных мутаций, которые не демонстрируют каких-либо фенотипических аномалий. Это ставит вопросы о функциональной значимости этих мутаций для канцерогенеза. В обзоре рассматривается гипотеза о проонкогенной направленности клеточного стресса, проявляющейся не только на стадии прогрессии опухоли, но и в качестве возможного события, инициализирующего злокачественную трансформацию. О важности адаптивных механизмов стрессовых ответов опухолевых клеток свидетельствуют новые успешные диагностические подходы, использующих экспрессионные сигнатуры генов клеточного стрессового ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response) для прогноза течения рака.

**Ключевые слова:** клеточный стресс; канцерогенез; старение; соматические мутации

**Для цитирования:** Московцев А.А., Зайченко Д.М., Иванов П.К., Солопова О.Н. Клеточный стресс, старение и канцерогенез. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 79-85.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.79-85

**Участие авторов:** Московцев А.А., Зайченко Д.М. – концепция обзора, отбор публикаций, критический пересмотр, написание статьи; редактирование текста, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации, оформление рукописи для публикации; Иванов П.К., Солопова О.Н. – обзор публикаций, критический пересмотр и редактирование текста. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

**Финансирование.** Грант Российского научного фонда № 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.09.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Moskovtsev A.A.<sup>1,2,3</sup>, Zaichenko D.M.<sup>1,3,4</sup>, Ivanov P.K.<sup>3</sup>, Solopova O.N.<sup>3</sup>

## Cellular stress, aging and carcinogenesis

<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education,  
Barrikadnaya St. 2/1, Moscow, 125993, Russian Federation;

<sup>3</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,  
Kashirskoye shosse 24, Moscow, 115478, Russian Federation;

<sup>4</sup>Peoples' Friendship University of Russia,  
st. Mikloukho-Maklaya 10, Moscow, 117198, Russian Federation

Somatic mutations, which may confer a selective advantage in somatic cell growth, are considered an important mechanism in the development of sporadic tumors. Studies of carcinogenic mutagenesis, the source of which can be both direct DNA damage and errors during DNA replication, are difficult due to the large number of concomitant non-cancerous mutations. Genomic data indicate the presence in normal tissues of a significant number of cells carrying critical oncogenic mutations that do not demonstrate any phenotypic abnormalities. This raises questions about the functional significance of these

mutations for carcinogenesis. This review examines the hypothesis about the pro-oncogenic role of cellular stress in carcinogenesis, which manifests itself not only at the stage of tumor progression, but also as an event that potentially initiates malignant transformations. Examples are given of new successful diagnostic approaches that use expression signatures of genes involved in cellular stress response to proteins with non-native conformations (Unfolded Protein Response), to predict the course of cancer.

**Keywords:** cellular stress; carcinogenesis; aging; somatic mutations

**For citation:** Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M., Ivanov P.K., Solopova O.N. Cellular stress, aging and carcinogenesis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 79-85. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.79-85

**Author's contribution:** Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M. – concept of the review, selection of publications, critical revision and writing of the article, text editing, approval of the final version of the manuscript for publication, design of the manuscript for publication; Ivanov P.K., Solopova O.N. – review of publications, critical revision and editing of the text. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** Alexey A. Moskovtsev, Ph.D, leading researcher, head of Cellular Stress Group, e-mail: bioinf@mail.ru

**Information about the authors:**

Moskovtsev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-8245>

Zaichenko D.M., <https://orcid.org/0000-0003-024-0065>

**Funding.** The work was supported by the Russian Science Foundation, grant # 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820/>

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

Received 11.09.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

Несмотря на десятилетия активных исследований, патогенез рака является все еще нерешенной проблемой, в связи с чем разрабатываемые методы терапии недостаточно эффективны. Существенными препятствиями при изучении развития онкологических заболеваний являются высокая сложность организации клетки, значительная гетерогенность опухоли, ее комплексная эволюция во времени.

Ключевым механизмом возникновения спорадических опухолей в настоящее время считается мутагенез – соматические мутации в драйверных генах, которые придают селективное преимущество в росте тем клеткам, где эти мутации произошли [1]. Накопление мутаций было отслежено в колоректальных опухолях. Сначала в клетках эпителия кишечника происходит мутация в гене-привратнике APC [2], которая приводит к развитию медленно растущей аденомы. Следующая мутация в гене KRAS инициирует второй раунд клонального роста [1, 3], и число клеток с двумя мутациями начинает существенно превышать число клеток, несущих только мутацию в привратнике, в результате этого формируется крупная аденома. Приобретение клонами дополнительных мутаций в таких генах как PIK3CA, SMAD4 и TP53 ассоциировано с формированием злокачественной опухоли, способной к инвазивному росту через базальную мембрану и метастазированию в лимфоузлы и дистантные органы [1, 4]. Существуют оценки, согласно которым каждая драйверная мутация придает очень небольшое селективное

преимущество в росте порядка всего лишь 0,4% в балансе клеточного деления или гибели [1, 5].

Хотя известны примеры последовательного приобретения мутаций, подобные вышеописанному, установление именно канцерогенного мутагенеза представляет собой большую проблему из-за большого числа сопутствующих «нераковых» мутаций, источником которых могут быть ошибки во время репликации ДНК при нормальной пролиферации клеток [6]. Важное значение для мутагенеза имеют прямые повреждающие воздействия на ДНК генотоксичными агентами с последующей репарацией, эффективность которой может быть различна в зависимости от состояния клеток. Соматический мутагенез, по-видимому, также является естественным побочным продуктом роста, обновления и восстановления тканей [7], включая внутриклеточную регенерацию. В результате зрелые ткани представляют собой генетическую мозаику [8].

Была обнаружена значимая корреляция между числом делений стволовых клеток в определенной ткани и возникновением рака этой ткани, что позволило предположить, что в большинстве случаев рак представляет собой внутренний процесс, который не является результатом действия экзогенных канцерогенов или факторов окружающей среды, а обусловлен случайными ошибками во время репликации клеточной ДНК [9]. Однако, существуют доказательства того, что и окружающая среда, и образ жизни оказывают существенное влияние на заболеваемость несколькими

ми распространенными типами рака, а влияние вышеописанных внутренних факторов на развитие рака может быть переоценено и не превышать 30% [10].

Клеточное деление и неблагоприятные внешние факторы могут сочетаться в патогенезе рака. Действие последних может приводить к развитию клеточного стресса. Известно, что ответ на клеточный стресс сопровождается начальным снижением уровня свободных, не связанных с белками-клиентами шаперонов, т.е. фактически происходит перенаправление шаперонов, участвующих в нормальных клеточных процессах, на связывание поврежденных белков. В результате этого скрытые мутации, “экранируемые” шаперонами, могут проявляться фенотипически и быть источником канцерогенных поломок в клетке. Кроме того, в условиях клеточного стресса вероятность ошибочного копирования нуклеиновых кислот в процессах транскрипции и репликации (при условии возвращения клеток в цикл) возрастает, что также может приводить к повышенному мутагенезу.

Постулатом теории соматических мутаций можно считать утверждение, что клетки, несущие критические онкогенные мутации, обязательно должны давать начало раковым опухолям [7], если только они не элиминируются в результате активации программы клеточной гибели через внутренние сигналы или внешние агенты, например, компоненты иммунной системы.

Тем не менее, геномные данные указывают на присутствие в нормальных тканях значительного числа клеток-носителей критических онкогенных мутаций, которые не демонстрируют каких-либо фенотипических аномалий [7].

Так, в исследовании Martincorena и соавт. [11] анализировали мутантные клеточные клоны в нормальном эпителии пищевода от девяти доноров (возраст от 20 до 75 лет). Соматические мутации накапливались с возрастом и, как считают авторы, в основном были обусловлены внутренними мутационными процессами. Была обнаружена сильная позитивная селекция клонов, несущих мутации в 14 генах, ассоциированных с развитием рака. У доноров среднего и пожилого возраста клоны с мутациями, связанными с раком, занимали значительную часть эпителия, при этом мутации NOTCH1 и TP53 встречались в диапазонах от 12 до 80% и от 2 до 37% клеток соответственно. Интересно, что распространенность NOTCH1 мутаций в нормальном пищеводе было в несколько раз выше, чем при раке пищевода.

Авторы обнаруживают в пищеводе даже более высокую частоту ассоциированных с раком мутаций, чем в коже, подвергаемой действию солнечного све-

та. Большинство драйверов рака пищевода определяется в нормальном эпителии пищевода как проходящий отбор — от десятков до сотен клонов клеток на квадратный сантиметр. С возрастом клоны, несущие ассоциированные с опухолями мутации, колонизируют большую часть эпителия. Однако, такая позитивная селекция и колонизация не сопровождается заметными изменениями в гистологии [11]. Это порождает вопросы о функциональной значимости этих мутаций для канцерогенеза. Т.е. сам по себе факт доминирования отдельных клонов может быть недостаточен для малигнизации. Однако, избыточный рост отдельных клонов, увеличение клеточной плотности может спровоцировать ухудшение условий микроокружения — снижение доступности питательных веществ, кислорода, рост механического напряжения и др. — все эти внешние факторы способны индуцировать клеточный стресс.

В исследовании [11] также отмечается, что, несмотря на схожесть в опухолеассоциированных мутациях, существуют принципиальные отличия между геномами клеток в мутантных клонах стареющего нормального эпителия и раковых клеток. Мутационная нагрузка в клетках стареющего эпителия примерно в десять раз ниже, чем при раке пищевода, наблюдается отсутствие мутагенеза APOBEC и хромосомной нестабильности. Кроме того, хотя клоны с драйверными мутациями широко распространены, среднее количество мутаций на клетку в нормальном пищеводе намного ниже, чем в раковых клетках. Авторы считают, что наблюдаемое согласуется с многостадийной теорией канцерогенеза [12].

Соматические мутации считаются фактором, способствующим старению: эти мутации наряду с повреждениями пассивно накапливаются в течение жизни в клетках и постепенно снижают клеточную приспособляемость [13]. Ряд авторов рассматривает позитивную селекцию клонов как фундаментальный механизм, распространенный в разных тканях — примеры включают в себя кровь, подвергающуюся воздействию солнца кожу, эпителий пищевода [14], и этот механизм может способствовать старению [15]. Тем не менее, положительный отбор мутантных клонов может способствовать не снижению, а повышению адаптивных способностей клеток. Это повышение может, вероятно, происходить в ущерб функциям этих клеток как тканевых элементов. Как уже было отмечено выше, ускорение селекции может приводить к прогрессирующему дисбалансу и ухудшению микроокружения, что будет требовать дальнейшей адаптации, и этот порочный цикл может воспроизводиться со все возрас-

тающей скоростью. Адаптация может происходить с включением механизмов стрессового ответа клеток, что, в свою очередь может способствовать ускорению накопления мутаций.

На важную роль регенерации и обновления в процессе накопления мутаций указывают изменения в клетках постмитотических тканей. Так, нейроны — терминально дифференцированные неделяющиеся клетки — накапливают соматические мутации с постоянной скоростью на протяжении всей жизни без клеточного деления, причем эта скорость сопоставима с таковой для митотически активных тканей [16].

Функциональные эффекты начальной предраковой селекции изучены недостаточно, и неясно, в какой степени она ускоряет переход к малигнизации. В целом, механизмы ранней инициации рака являются плохо понимаемыми, несмотря на все увеличивающиеся объемы данных исследований, направленных на изучение процессов накопления мутаций. Тем не менее, изменения адаптивных свойств популяции клеток с возрастом, происходящие путем только соматических мутаций, соматических мутаций с последующим отбором, а также за счет активации программ клеточного стрессового ответа, по-видимому, вносят вклад в процессы злокачественной трансформации, при этом указанные механизмы могут взаимно дополнять друг друга.

Клеточные стрессовые ответы в своей начальной фазе способствуют повышению адаптивных свойств клеток и их выживанию, и они считаются проонкогенными механизмами, способствующими в том числе устойчивости клеток к противоопухолевой терапии, и опухолевой прогрессии. Было выдвинуто предположение, что в инициацию рака может быть вовлечена активация программы ответа клетки на стресс [17].

Повышенная экспрессия белков теплового шока (HSPs) играет ключевую роль в защите опухолевых клеток от спонтанного апоптоза, а также от апоптоза, вызванного противоопухолевой терапией [18]. Другие типы клеточного стресса, такие, как стресс эндоплазматического ретикулума, также являются важным проадаптивным элементом опухолевых клеток. Подавление транскрипционных программ клеточного стресса в ответ на протеотоксичность препятствует или задерживает экспериментально индуцированный канцерогенез [19].

По нашим данным [20], активация программы клеточного стресса влечет за собой увеличение экспрессии генетических повторов. Активация ретротранспозонов может быть механизмом, обуславливающим токсический компонент стрессового ответа через повреждение ДНК, активацию клеточных сенсоров ДНК

и запуск соответствующих сигнальных каскадов, таких, как STING, а также формирование провоспалительного профиля секретомы, и подавление экспрессии компонентов биогенеза микроРНК — в частности, при стрессе эндоплазматического ретикулума нами показано снижение экспрессии DICER и глобальное подавление экспрессии всего класса микроРНК [20]. Снижение уровня экспрессии всего класса микроРНК может приводить к частичной дедифференцировке клеток, что является признаком опухолевой прогрессии. Такое эпигенетическое изменение на уровне всего класса микроРНК, по-видимому, может быть передано клеточным потомкам. Интересно, что при клеточном старении, индуцированном стрессом эндоплазматического ретикулума, снижение биогенеза микроРНК не наблюдалось [21].

Ряд авторов предполагает, что рак может быть прямым результатом адаптации клеток к стрессовым условиям, и что клеточные механизмы буферизации стресса не являются вспомогательными, а играют ключевую роль в онкогенезе [7].

Одним из элементов инициации опухолевого роста могут быть множественные или хронические клеточные стрессы с соответствующими постстрессорными фазами. В одном известном методе трансформации фибробласты мышинных эмбрионов в культуре подвергали воздействию рентгеновских лучей (400 рад), а затем инкубировали в течение нескольких дней до конфлюэнта и, таким образом, остановки пролиферации. Через 30 дней дальнейшей постконфлюэнтной инкубации поверх монослоя конфлюэнтных клеток появились очаги трансформированных клеток [22]. В данном случае фибробласты подвергаются нескольким типам стресса — так называемому стрессу культивирования при переводе клеток в условия *in vitro*, облучению и высокой клеточной плотности. В моделях канцерогенеза *in vivo* кожа мышей, получивших однократную дозу полного канцерогена, становится восприимчивой к образованию опухолей при повторном воздействии немутагенного промотора — соединения, не способного само по себе индуцировать рак. У грызунов химические канцерогены с генотоксическим потенциалом вызывают рак толстой кишки, но рак также индуцируется декстрансульфатом натрия, который не является генотоксичным, но вызывает колит [23]. Хорошо известно, что люди, страдающие воспалительными заболеваниями кишечника, включая язвенный колит и болезнь Крона, подвержены значительно более высокому риску развития рака толстой кишки [24]. Это указывает на участие провоспалительных механизмов в канцерогенезе. Негенотоксичные соединения могут вызы-

вать определенные типы клеточного стресса, например, индуцировать протеотоксический стресс, в ходе которого белки будут терять нативные конформации, агрегировать и вносить дисбаланс в протеостаз [25]. Это может нарушать их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, липидами, работу сигнальных систем клетки. В ходе клеточного стресса могут меняться физико-химические параметры цитоплазмы и изменяться условия для фазового перехода жидкость-жидкость, что может сказываться на составе и динамике различных рибонуклеопротеиновых гранул.

В механизмах канцерогенеза важную роль играют клеточное микроокружение и стромальные компоненты. В экспериментах на животных показано, что если строма молочной железы, лишенная сопутствующих эпителиальных клеток, подвергалась воздействию физических или химических канцерогенов, возможна индукция опухолей эпителия молочной железы [26]. Таким образом, в данном случае может иметь место опосредованный канцерогенез. Могут ли быть задействованы в данном случае механизмы передачи стрессового состояния между клетками — это вопрос, требующий дальнейших исследований, однако, вовлечение в этот процесс провоспалительного секрета не вызывает сомнений.

В последнее время в литературе появляются данные, которые указывают на возможность передачи состояния активации ответа на стресс ЭПР (UPR) от одних клеток и тканей к другим. Эта трансмиссия была впервые замечена в *C.elegans* между нейронами червя и клетками его кишечника: мутации в нейрональном рецепторе могут вызывать активацию UPR в дистальных тканях, а стресс-ассоциированный сплайсинг XBP1 в нервной системе приводит к активации UPR в клетках кишечника, что, в свою очередь, улучшает организменную устойчивость к стрессу ЭПР, протеостаз и увеличивает продолжительность жизни [27, 28]. Экспрессия XBP1 в нейронах мышшиного гипоталамуса приводит к усилению ответа UPR в печени по аналогичному вышеописанному клеточно-неавтономному механизму активации UPR [29]. Это приводит к более высокому расходу энергии и устойчивости к ожирению, вызванному диетой, а также к повышению чувствительности к инсулину, что способствует нормализации уровня глюкозы.

Кроме того, исследования на культурах клеток человека показали, что кондиционированная среда из ЭПР-стрессированных опухолевых клеток может активировать UPR в иммунных клетках и гепатоцитах, но достоверность этого сигнального механизма передачи оспаривается [30, 31]. В опухолях активация UPR

посредством факторов, таких, как гипоксия и недостаток питательных веществ, может привести к «упреждающей» активации UPR в соседних клетках [32].

В процессах передачи между клетками активного состояния UPR молекулы-посредники не установлены. Возможно, эту роль могут играть некоторые предшественники сигнальных молекул DAMP. Недавно было показано, что стресс ЭПР, вызванный двумя различными механизмами в клетках хориокарциномы BeWo, приводит к высвобождению внеклеточных везикул (EV), несущих молекулы DAMP, что может способствовать усилению системной воспалительной реакции, характерной для преэклампсии — расстройства при беременности, а также может иметь отношение к другим хроническим воспалительным заболеваниям [33]. Среди этих DAMPs наиболее представленными в везикулах оказались белки HMGB1, hsp70 и гистон H3. При преэклампсии, уровни HMGB1, hsp70, внеклеточной АТФ, S100B и митохондриальной ДНК существенно повышены в циркуляторном русле. Механизм продукции экстраклеточных везикул с DAMP при стрессе ЭПР не установлен, но следует отметить, что снижение уровня активных форм кислорода блокировало эту продукцию. Интересно то, что окислительный стресс часто сопровождает стресс ЭПР.

Таким образом, стрессовый ответ клеток может являться важным механизмом инициации и прогрессии рака. В последнее время значительно вырос интерес к стрессовым генам для прогноза течения рака. В ряде работ были использованы экспрессионные сигнатуры генов клеточного стресса в качестве прогностических маркеров при раке. Показано, что сигнатура активации генов UPR предсказывает клинический исход при ER $\alpha$ -положительном раке молочной железы [34]. В этой работе была разработана сигнатура генов ответа на неправильно свернутые белки [35], состоящая из генов, кодирующих компоненты сигнальных путей UPR, и их транскрипционные мишени. Используя данные 261 пациента с ER $\alpha$ + раком молочной железы, каждому из которых была присвоена высокая или низкая степень геномной сигнатуры UPR, авторы наблюдали сокращение времени до рецидива у пациентов со сверхэкспрессией сигнатуры UPR. Чтобы оценить сигнатуру UPR у пациентов, проходящих терапию тамоксифеном, образцы, собранные от 474 ER $\alpha$ + пациентов с раком молочной железы до начала 5-летней терапии тамоксифеном, были отнесены к группам низкого, среднего или высокого риска активного ответа UPR. Повышенная начальная экспрессия сигнатуры гена UPR хорошо коррелировала с последующим сокращением времени до рецидива. В когор-

те из 236 ER $\alpha$ + пациентов с раком молочной железы сверхэкспрессия UPR была сильным прогностическим фактором снижения выживаемости. Авторы заключают, что степень активации UPR является мощной прогностической генной сигнатурой при ER $\alpha$ + раке молочной железы для разделения пациентов на группы высокого и низкого риска рецидивов. Расширение сигнатур генов за счет комбинации стрессовых путей и стресс-ассоциированных некодирующих РНК, а также дополнение мутационными профилями может позволить построить более эффективные прогностические стрессовые сигнатуры опухолей.

### Литература

#### (п.п. 1–34 см. References)

35. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система UPR (Unfolded Protein Response). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 97–108.

### References

1. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W. Cancer Genome Landscapes. *Science* (New York, NY), NIH Public Access. 2013; 339: 1546. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1235122>
2. Kinzler K.W., Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997; 386: 761–3. <https://doi.org/10.1038/386761A0>
3. Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61, 759–67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-1)
4. Jones S., Chen W.D., Parmigiani G., Diehl F., Beerenwinkel N., Antal T., et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences. 2008; 105: 4283. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0712345105>
5. Bozic I., Antal T., Ohtsuki H., Carter H., Kim D., Chen S., et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences. 2010; 107: 18545–50. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1010978107/-/DCSUPPLEMENTAL>
6. Lynch M. Evolution of the mutation rate. *Trends in Genetics: TIG*, NIH Public Access. 2010; 26: 345. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2010.05.003>
7. Aranda-Anzaldo A., Dent M.A.R. Is cancer a disease set up by cellular stress responses? *Cell Stress & Chaperones*, Springer. 2021; 26: 597. <https://doi.org/10.1007/S12192-021-01214-4>
8. Oota, S. Somatic mutations – Evolution within the individual. *Methods* (San Diego, Calif), *Methods*. 2020; 176: 91–8. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2019.11.002>
9. Tomasetti C., Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* (New York, NY), NIH Public Access. 2015; 347: 78. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260825>
10. Wu S., Powers S., Zhu W., Hannun, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, NIH Public Access. 2016; 529, 43. <https://doi.org/10.1038/NATURE16166>
11. Martincorena I., Fowler J.C., Wabik A., Lawson A.R.J., Abascal F., Hall M.W.J., et al. Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* (New York, NY), Europe PMC Funders. 2018; 362: 911. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU3879>
12. Armitage P., Doll R. The Age Distribution of Cancer and a Multistage Theory of Carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, Nature Publishing Group. 1954; 8, 1. <https://doi.org/10.1038/BJC.1954.1>
13. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*, Europe PMC Funders. 2013; 153: 1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
14. Martincorena I., Roshan A., Gerstung M., Ellis P., Van Loo P., McLaren S., et al. (2015) High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* (New York, NY), Europe PMC Funders. 348, 880. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA6806>
15. Martincorena, I., Raine, K.M., Gerstung, M., Dawson, K.J., Haase, K., Van Loo, P., et al. (2017) Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell*, Elsevier. 171, 1029. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.09.042>
16. Abascal, F., Harvey, L.M.R., Mitchell, E., Lawson, A.R.J., Lensing, S. V., Ellis P. et al. (2021) Somatic mutation landscapes at single-molecule resolution. *Nature*, Nature. 593, 405–10. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03477-4>
17. Brash, D. and Cairns, J. (2009) The mysterious steps in carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, Nature Publishing Group. 101, 379. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6605171>
18. Ciocca, D.R. and Calderwood, S.K. (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, Springer. 10, 86. <https://doi.org/10.1379/CSC-99R.1>
19. Gabai, V.L., Meng, L., Kim, G., Mills, T.A., Benjamin, I.J. and Sherman, M.Y. (2012) Heat Shock Transcription Factor Hsf1 Is Involved in Tumor Progression via Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 and RNA-Binding Protein HuR. *Molecular and Cellular Biology*, American Society for Microbiology (ASM). 32, 929. <https://doi.org/10.1128/MCB.05921-11>
20. Mesitov M.V., Soldatov R.A., Zaichenko D.M., Malakho S.G., Klementyeva T.S., Sokolovskaya, A.A., et al. Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group. 2017; 7: 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep46080>
21. Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Kubatiev A.A., Moskovtsev A.A. (2023) MicroRNA Biogenesis in Cell Senescence Induced by Chronic Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology, Pleiades Publishing*. 2023; 57: 670–83. <https://doi.org/10.1134/S0026893323040192>
22. Kennedy A.R., Fox M., Murphy G., Little J.B. Relationship between x-ray exposure and malignant transformation in C3H 10T1/2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 7262–6. <https://doi.org/10.1073/PNAS.77.12.7262>
23. Tamaru T., Kobayashi H., Kishimoto S., Kajiyama G., Shimamoto F., Brown W.R. Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis of rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 1993; 38: 529–37. <https://doi.org/10.1007/BF01316510>

24. Lakatos P.L., Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World Journal of Gastroenterology* : WJG, Baishideng Publishing Group Inc. 2008; 14: 3937. <https://doi.org/10.3748/WJG.14.3937>
25. Kukharsky M.S., Everett M.W., Lytkina O.A., Raspopova M.A., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov, R.K., et al. Protein Homeostasis Dysregulation in Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Molekuliarnaia Biologiya, Mol Biol (Mosk)*. 2022; 56: 1044–56. <https://doi.org/10.31857/S0026898422060143>
26. Maffini M.V., Soto A.M., Calabro J.M., Ucci A.A., Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *Journal of Cell Science, J Cell Sci*. 2004; 117: 1495–502. <https://doi.org/10.1242/JCS.01000>
27. Taylor R.C., Dillin A. XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell, Cell*. 2013; 153: 1435. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.042>
28. Imanikia S., Özbey N.P., Krueger C., Casanueva M.O., Taylor R.C. Neuronal XBP-1 Activates Intestinal Lysosomes to Improve Proteostasis in *C. elegans*. *Current Biology* : CB, Curr Biol. 2019; 29: 2322–2338.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2019.06.031>
29. Williams K.W., Liu T., Kong X., Fukuda M., Deng Y., Berglund E.D., et al. (2014) Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metabolism*. 20, 471–82. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.06.002>
30. van Ziel A.M., Wolzak K., Nölle A., Hoetjes P.J., Berenjeno-Correa E., van Anken E., et al. (2020) No evidence for cell-to-cell transmission of the unfolded protein response in cell culture. *Journal of Neurochemistry, John Wiley & Sons, Ltd*. 152, 208–20. <https://doi.org/10.1111/JNC.14856>
31. Mahadevan N.R., Rodvold J., Sepulveda H., Rossi S., Drew A.F., Zanetti M. Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 6561–6. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1008942108>
32. Shapiro D.J., Livezey M., Yu L., Zheng X. and Andruska N. Anticipatory UPR Activation: A Protective Pathway and Target in Cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Elsevier Inc. 2016; 27: 731–41. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.06.002>
33. Collett G.P., Redman, C.W., Sargent, I.L., Vatish M. Endoplasmic reticulum stress stimulates the release of extracellular vesicles carrying danger-associated molecular pattern (DAMP) molecules. *Oncotarget, Impact Journals, LLC*. 2018; 9: 6707. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.24158>
34. Andruska N., Zheng X., Yang X., Helferich W.G., Shapiro D.J. Anticipatory Estrogen Activation of the Unfolded Protein Response is Linked to Cell Proliferation and Poor Survival in Estrogen Receptor  $\alpha$  Positive Breast Cancer. *Oncogene*, NIH Public Access. 2015; 34: 3760. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.292>
35. Mesitov M.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev, A.A. Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patologicheskaja Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2013; 57(4): 97–108. (In Russian)

#### Сведения об авторах:

**Московцев Алексей Александрович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., руководитель группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП; доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; вед. науч. сотр. группы медицинской биотехнологии лаборатории биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru;  
**Зайченко Данила Михайлович**, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП; мл. науч. сотр. группы медицинской биотехнологии лаборатории биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ассистент, каф. биологии и общей генетики медицинского института РУДН;

**Иванов Павел Константинович**, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. группы медицинской биотехнологии лаборатории биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

**Солопова Ольга Николаевна**, канд. биол. наук, зав. лаб. биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

**Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.**

## Язык как орган анализа

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

Эволюция приспособила язык человека, кроме речи, к участию в первичной механической обработке пищи, анализе её содержания и проглатывании. Язык может определять место расположения пищи в ротовой полости, вообще, и на поверхности языка, в частности. Локализация и осознание вкусового ощущения происходит с большой топографической точностью: на том или ином *ограниченном* участке полости рта или поверхности языка. На этой способности языка основана идея сенсорной замены *видеообразов* пространства *тактильным* восприятием языка – vision substitution by tactile image projection. Предложены и созданы (пока их число ограничено) устройства, улучшающие качество жизни слепых и реабилитацию двигательных расстройств.

**Ключевые слова:** визуально тактильная замена; постуральная стабильность; сенсорное усиление; видеоанализ языком; электротактильная стимуляция

**Для цитирования:** Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Язык как орган анализа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 86-92.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.86-92

**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 22.09.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

**Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.**

## Language as an organ of analysis

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

Evolution has adapted the tongue, besides speaking, to participate in the primary mechanical processing of food, to analyze its content, and to swallow it. The tongue can determine the location of food in the oral cavity in general, and specifically on the tongue surface. Localization and perception of the taste sensation occur with a great topographic accuracy on one or another limited area of the oral cavity or the tongue surface. This ability of the tongue underlies the idea of *vision substitution by the tactile image projection*. Devices have been proposed and created (so far in limited number) that improve quality of life of the blind and the rehabilitation in movement disorders.

**Keywords:** visually tactile substitution; postural stability; sensory enhancement; video analysis by tongue; electrotactile stimulation

**For citation:** Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Language as an organ of analysis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 86-92. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.86-92

**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:** Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 22.09.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

Созданием такого важного органа как язык эволюция обеспечила не только поглощение и первичную, механическую обработку пищи. Сформировался орган физического и химического исследования внешней среды — анализатор окружающего пространства. Достаточно рациональное и точное восприятие и отражение в мозг тактильной информации, полученной механическим контактом языка со средой, способствует успеху выживания особей и видов. Движения языка имеют решающее значение для глотания, речи и дыхания, а дисфункция движений языка может привести к дисфагии, дизартрии и обструктивному апноэ во сне. Сеть обработки поступающих от языка сигналов включает в себя корковые и подкорковые структуры, которые представляют сознанию многочисленный набор отдельных и объединенных в комплексы стимулов, встречающихся в окружающем пространстве. Стимулов, по сути, тактильных и вкусовых, но опытом жизни предков и особи, когнитивной обработкой этого опыта мозгом, часто превращаемых в эквиваленты визуальным стимулам. Стандартная по физиологическому значению для разных классов животных пищевая функция языка, но выполняемая в различных условиях обитания, изменила соответственно этим условиям морфологию языка. Так, например, объясняют отсутствие кератинизации языка амфибий и кератинизацию в большей или меньшей степени языка других позвоночных [1]. Следует обратить внимание, что кератинизация языка многозначное событие эволюции позвоночных, отражающееся в освоении новых ресурсов пищи.

Сравнительные исследования морфологии языков современных и вымерших позвоночных позволяют предположить важную роль приспособления морфологии языка к перемещению позвоночных из пресной воды на сушу или в морскую воду, а также роль ороговения лингвального эпителия при перемещении из влажных условий в сухие или в морскую воду. Считается, что эволюционные изменения языка лежат в основе прогресса в приспособлении к смене пищи, что является движителем в расширении ареала обитания позвоночных.

Один из видов позвоночных — Человек разумный, *Homo sapiens*, уже сегодня, не откладывая, успешно пытается применять язык для анализа данных за пределами определенной эволюцией области вкуса. Люди нетерпеливы и технологии проворнее эволюции.

У идеи использовать язык для анализа среды можно найти «прародителей». К ним, может быть, следует отнести Bach-y-Rita P с сотрудниками, опубликовавших в 1969 году в Nature статью о возможности за-

менять *видимость* глазами на *тактильные* ощущения [2]. Статьи тех же авторов, с тем же названием и в тот же год, публиковались ещё трижды, но, к сожалению, с той же невозможностью прочитать их текст или, хотя бы, резюме в интернете. Через 3 года после появления статей Bach-Y-Rita P уже без соавторов написал и издал в Кембридже книгу по обсуждаемой теме [3]. К сожалению, она также оказалась для нас недоступной.

Способность и абсолютная, жизненно важная необходимость языка для анализа внешней среды имеют своим результатом некоторые благоприятные моменты. Например — отсутствие или незначительность возрастных изменений мышечной массы языка, в отличие от грубо выраженных и широко распространенных изменений — возрастной атрофии неязыковой поперечнополосатой мускулатуры тела.

Вкусовое ощущение вызывается, когда находящееся в растворе вещество через поры попадает на вкусовые луковицы и возбуждает хеморецепторы. Вкусовые луковицы, или почки, содержат концевой рецепторный аппарат вкусового анализатора и располагаются в сосочках языка, а также на заднем крае неба. В эпителии глотки и надгортанника даже внутри одной вкусовой луковицы могут находиться рецепторы разных базовых вкусов. Каждая вкусовая луковица состоит из поддерживающих клеток и клеток-рецепторов вкуса.

В языке старого человека не происходит характерная для других поперечнополосатых мышц стариков, возрастная утрата силы с соответствующими изменениями функции, макро- и микроструктуры [4,5]. Конечно, действует то обстоятельство, что нагрузка на язык при старении не снижается или снижается меньше, чем нагрузка на прочую поперечнополосатую мускулатуру. Это эффект длительно и постоянно действующего фактора. Есть свидетельства и немедленного действия нагрузки. У жующих в положении стоя молодых мужчин равновесие существенно улучшается по сравнению с теми же людьми стоящими с открытым или закрытым, но не жующим ртом ( $p < 0.0001$ ) [6].

Sienco с сотрудниками [7] этот и подобные эффекты объясняют сенсорным усилением (sensory augmentation — SA), которое достигается добавлением мощности обуславливающего и ориентирующего баланса вибротактильного сигнала. Баланс сохраняющий и усиливающий эффект может достигаться не только SA, но и сенсорной заменой sensory substitution SS — изменением модальности сигнала: тактильной, звуковой, визуальной. Оригинальная и высоко эффективная форма SS: наблюдение собственной, сохранившейся после инсульта подвижность руки [8] или ноги [9]

в зеркале, расположенном так, что в нём сохранившаяся конечность *кажется*, больному его парализованной конечностью. *Видимое* всего лишь, но *не осуществляемое реально*, движение парализованной конечности восстанавливает нарушенные инсультом нейронные связи, способствует появлению её реального движения, увеличению амплитуды и силы этого движения. Thieme и соавторы [8] включили в свою публикацию о результатах зеркальной сенсорной замены 62 клинических исследования такого типа, с участием 1982 больных в возрасте от 30 до 73 лет. Зеркальную терапию проводили в течении 2-8 недель 3-7 раз в неделю, с продолжительностью каждого сеанса 15-60 минут. У 95% больных обнаружено положительный эффект.

Китайцы, вероятно даже не врачи, давно заметили, что при бессоннице язык выглядит не так, как у спящих достаточно людей. В традиционной китайской медицине исследование языка осуществляется как важнейшая базовая процедура, обязательная для принятия терапевтических решений. Представляем результаты профессионального изучения этого наблюдения, опубликованные в американском журнале китайской медицины [10]. Исследовали состав микробиоты рта с различными видами налетов на языке при бессоннице сравнительно с нормально спящими людьми. Для сохранения и развития полезной традиции авторы решили сопоставить состояния микробиома полости рта пациентов с хронической бессонницей с особенностями поверхности их языков.

В этой работе использовали секвенирование гена *16S рРНК* для анализа изменений бактериального профиля полости рта. Изменения распространялись на 3 типа: Proteobacteria, Bacteroidetes, Gracilibacteria и 4 рода: Streptococcus, Prevotella, Rothia, и Neisseria. Бессонница у пациентов была хронической, различной тяжести и с различным видом налетов на языке, отличающимся от вида языка у здоровых, достаточно спящих людей. Авторы обнаружили связь изменений микробиома рта, выражающихся в систематике и обилии бактерий, с тяжестью хронической бессонницы и внешним видом поверхности языка.

В старости сохраняется структура и сила языка у людей, сохранивших зубы или адекватные имплантаты [11] и полноценно жующих [12]. В силе языка носители зубных имплантатов всё же уступали сохранившим натуральные зубы ( $p < 0.05$ ). Кончик языка имеет малые соматосенсорные рецептивные поля – сосочки, сравнимые по биологическому значению этой рецепции с полями кончиков пальцев. Это обеспечивает точную пространственную дифференциацию даже близко располо-

женных сигналов и высокую тактильную чувствительность. Исследование Allison с сотрудниками [13] было предпринято для ответа на вопрос: влияет ли плотность расположения грибовидных сосочков и/или чувствительность их к пропилиптоурацилу положительно или отрицательно на воспринимаемую интенсивность сигнала и/или способность к различению близко расположенных языковых электротактильных стимулов. Количество и распределение грибовидных сосочков были определены для 15 участников анализа. Их подвергли электротактильной стимуляции (ETS) и попросили сообщить о количестве и интенсивности воспринимаемых стимулов. Затем количество и распределение грибовидных сосочков сравнивали с характеристиками результатов ETS, используя статистический анализ. Он показал, что эффективность распознавания была связана лишь с плотностью расположения сосочков. Эти данные свидетельствуют о том, что люди с высоким числом и плотностью расположения грибовидных сосочков в переднемедиальной области языка могут лучше, точнее использовать языковую ETS для сенсорной диагностики.

Установлена роль шейно-челюстной сенсомоторной системы в управлении балансом тела [14]. Язык является главной частью этой системы, связывает и корректирует действие и результат в выполнении целенаправленных точных двигательных задач, таких как постуральный баланс, прием пищи, питье и речь. Результаты клинических наблюдений показали, что положение языка относительно верхних резцов может улучшить постуральную стабильность при стоянии на неустойчивой поверхности слепых, но здоровых в остальном молодых людей.

Вкусовое ощущение – это процесс и результат преобразования химических свойств пищи в нейронный код мозга. Вкусовая информация первоначально формируется возбуждением вкусовых (грибовидных) сосочков языка, проходит по афферентным вкусовым нервным волокнам к нейронам сенсорных ганглиев и, наконец, поступает во вкусовые центры мозга. Недавние достижения в оптическом выражении механизмов и путей передачи вкусовых ощущений представлены в обзоре [15]. Авторы сообщают как вкус, обусловленный физическими и химическими особенностями попавшей в рот пищи по-разному, в соответствии с этими особенностями, раздражает рецепторы нейронов сенсорных ганглиев во вкусовых сосочках языка. Эти различия передаются через афферентные вкусовые нервы нейронам сенсорных ганглиев и, наконец «сообщаются» вкусовым центрам мозга, превращая химическую идентичность пищи или чего-то попавшего на язык в нейронный код.

Вкусовые сосочки могут различать, по крайней мере, пять основных вкусов: сладкий, горький, кислый, соленый и, так называемый, «умами» (в переводе с японского — приятный), обусловленный глутаматами — мясной, вкус популярный в Японии и Китае, но для русского и европейца необсуждаемый. Не потому, что его нет в нашей еде, а потому, что не привыкли его замечать. Этими пятью словами вкусового лексикона выражаются вполне материальные, сущностные характеристики исследуемых образцов. При таком положении, у кого «повернется язык» сказать, что язык не есть инструмент анализа окружающего мира?

Поскольку ниже речь пойдет, в основном, об анализе пространства, стоит напомнить, что для видящего «избалованного здоровьем» человека мысль о слепоте связана с меланхолией, большой боязнью неизвестного и полного опасностей окружения, бесконечной ночи, невозможности свободно двигаться, хотя бы приемлемо (уже не помышляя о комфорте) ориентироваться в пространстве, в повседневном быте, постоянной угрозе падения, болезненного столкновения с чем-либо, трудностях при приеме пищи. Пример величайшей успешности слепого человека — Гомера вдохновляет немногих. Он жил очень давно, а сознание склонно воспринимать историю как сказку. Чувство справедливости и уважения к предкам обязывает напомнить, что технология Tactile Vision Substitution (TVS) изобретена и используется человеком уже в течении тысячелетий. Её пример: слепой, контролирующий, «ощупывающий» и «перкуссирующий» окружающее пространство тростью. Удивлявшая три века назад Дидро [16] и продолжающая удивлять современников, успешность таких действий объясняется длительной практикой чувствительности осязания и слуха слепых. Неслучайно доля музыкантов среди них явно превышает долю музыкантов среди зрячих. В качестве примера указывают на современницу Дидро, слепую (с двухлетнего возраста) пианистку Mélanie de Salignac самостоятельно научившуюся не только играть на фортепиано, но использованием вырезанных букв, цифр и нот читать, писать, переписываться с друзьями, записывать мелодии. Показателен также пример SS-исследования [17]. Авторам удалось определить нейронные субстраты сенсорных замещений и выявить масштабы пластических процессов, при анализах окружающей среды. Суть дела оказалась в перепрограммировании, уровне его распространения по сетям. В настоящее время производятся электронные ультра-трости, информирующие о препятствиях не только при их контакте с препятствием, но и на достаточном по горизонтали и вер-

тикали расстоянии до препятствия, что обеспечивает безопасность ходьбы [19].

Теоретическую разработку и практический опыт устройства не избавляющего полностью от трудностей слепоты, но облегчающего жизнь, снижающего остроту и вероятность реальных и воображаемых угроз описал сотрудник университета Висконсин-Мэдисон Kaczmarek [18]. Он создал устройство Tongue Display Unit (TDU), которое стало универсальной платформой для применения и анализа результатов электро-тактильной стимуляции языка. Описал также практику применения TDU для сенсорной замены и нейрореабилитации. Создаваемые таким устройством ощущения (вибрация, покалывание, давление) могут использоваться для передачи временной и пространственной информации, которая обычно поступает через другие сенсорные каналы, такие как зрение, слух, проприоцепция и вестибулярный аппарат. Тактильная чувствительность языка в оценке давления и пространства настолько значимо представлена в мозге, что может конкурировать с рукой — основным человеческим органом осязания. Постоянство гидратации языка стабилизирует его электродную способность. Электро-тактильная стимуляция вызывает тактильные ощущения в месте расположения небольшого поверхностного электрода при пропускании узко локализованного электрического тока, стимулирующего афферентные нервные волокна.

Мотивацией создания TDU было замещение видео картины тактильным восприятием Tactile Vision Substitution (TVS). По сути — язык в роли глаза. С помощью TVS управляемая пользователем видеокамера захватывает изображения окружающей среды в реальном времени и обеспечивает пространственно соответствующую зрительно воспринимаемой мозгом пользователя, но созданную тактильной стимуляцией поверхности его языка картинку окружающего пространства. Kaczmarek уверяет, что, основываясь на тактильных ощущениях, когда, например, области интенсивной тактильной стимуляции могут соответствовать светлым областям изображения с камеры, пользователи «могут выполнять визуальные задачи, такие как чтение текста, идентификация и локализация объекта, осуществлять разделение и координацию «рука-глаз» (например, ловить мяч) и, что более актуально и реально уклоняться от препятствий при ходьбе.

У людей с отсутствием какой-либо клинически заметной вестибулярной функции (двусторонний вестибулярный дефицит) наблюдается немедленное улучшение поструральной стабильности при использовании TVS, которая в этом случае отображает наклон головы

как положение небольшого пятна электротактильной стимуляции на языке. Такие улучшения сохраняются от нескольких часов до нескольких недель, а часто и дольше, даже после извлечения устройства изо рта, в зависимости от совокупного времени использования системы субъектом (типичное использование – 2 полчасовых сеанса в день).

Недавно было показано, что TDU или TDU-индуцированная стимуляция языка, проводимая одновременно с упражнениями на равновесие и походку, приводит к долгосрочному уменьшению неблагоприятных симптомов.

Современное состояние знаний и технологий позволяет манипулировать сенсорными модальностями новыми, непривычными способами. Так в исследовании [19] описаны идея создания и результат практического испытания устройства визуально-слуховой замены: sensory substitution device (SSD). Использован алгоритм преобразования изображения в звук, с целью создать суррогат видимости, достаточный, чтобы слепому человеку определить форму и расположение (спереди, сзади, справа, слева) объекта. Слепые испытуемые устройства в большинстве справились с заданием после 60-минутной обучающей сессии. Некоторые могли даже нарисовать презентацию. Увеличение продолжительности занятий повышало точность ответов.

Разновидностью SSD, но более точным, комфортным, удобным для восприятия и реагирования является устройство отображения языка Tongue Display Unit (TDU) предложенное Качмарекком [18]. Автор описал теорию, конструкцию и опыт применения электротактильной стимуляции дорзальной поверхности языка для сенсорной замены и нейрореабилитации. Приемник информации: помещаемая на спинку языка лента с квадратом расположенных электродов 12 x 12 (всего 144 электрода). Оказывается, язык настолько точный приемник ощущений, что даже при такой тесноте расположения безошибочно различает соседние точки-электроды.

Электротактильная стимуляция вызывает ощущение прикосновения, вибрации, покалывания, давления, раздельно в каждом столь малом участке – месте расположения электрода. Однако, для обсуждаемой пространственно ограниченной области интереса есть и более пространственно ограниченный и более удобный и более чувствительный рецептор: электротактильный дисплей – язык. Он очень подвижный, высоко чувствительный к различиям локализации и силы сигнала. По широте представительства в мозге не уступает рукам – главному органу тактильной информации. Слизистая оболочка нёба, щёк, губ, всего рта,

увеличивает и без того великие тактильные возможности языка.

Каждая вкусовая почка дорзальной поверхности языка содержит несколько дюжин вкусовых клеток. Сама вкусовая почка не достигает поверхности слизистой языка – в полость рта выходит только вкусовая пора. Растворенные в слюне вещества диффундируют через пору в наполненное жидкостью пространство над вкусовой почкой, и там они соприкасаются с ресничками – наружными частями вкусовых клеток. На поверхности ресничек находятся специфические рецепторы, которые, избирательно связывая молекулы, растворенные в слюне, переходят в активное состояние и запускают каскад биохимических реакций во вкусовой клетке. В результате последняя высвобождает нейротрансмиттер, он стимулирует вкусовой нерв, и по нервным волокнам в мозг уходят электрические импульсы, несущие информацию о специфике, интенсивности и локализации вкусового сигнала. Все рецепторы относятся к обширному семейству, сопряженных с G-белками GPCR (G protein-coupled receptors). Эти белки находятся внутри клетки, возбуждаются при взаимодействии с активными рецепторами и запускают все последующие реакции. Кстати, помимо вкусовых веществ рецепторы типа GPCR могут распознавать гормоны, нейромедиаторы, пахучие вещества, феромоны – словом, они подобны антеннам, принимающим самые разнообразные сигналы.

Вкус – это мультимодальное ощущение. Должна свестись воедино следующая информация: от химических избирательных вкусовых рецепторов, тепловых рецепторов, данные от механических датчиков зубов и жевательных мускулов, а также сигналы обонятельных рецепторов, на которые действуют летучие компоненты пищи.

В таламусе вкусовые сигналы соединяются с обонятельными и вместе уходят во вкусовую зону коры головного мозга. Распознавание вкуса – комплексный процесс. Вся информация от вкусовых, термических, обонятельных рецепторов и данные от механических датчиков, поступает в мозг. Мы практически мгновенно понимаем, что едим. Вся информация о продукте обрабатывается мозгом одновременно. Например, когда во рту клубника, это будут сладкий вкус, клубничный запах, сочная с косточками консистенция. Сигналы от органов чувств, обработанные во многих частях коры головного мозга, совмещаются и дают комплексную картину. Есть основания, упоминавшиеся выше, считать, что вкусовое ощущение формируется в результате комбинации ограниченного числа базовых вкусов.

Сенсорная замена и электронные средства имеют преимущество перед инвазивными технологиями бла-

годаря использованию механизмов пластичности, которые естественным образом срабатывают в мозге слепых при обучении другим (не визуальным) модальностям. Имеется в виду благоприятное течение событий, свободное от осложняющих патологических процессов (инсульт), тем более повреждения сенсорной сферы при Covid-19 [20].

Хотя некоторые SSD обеспечивают слепым «визуальное» восприятие, превышающее установленный ВОЗ порог слепоты и якобы не представляющее опасности для здоровья, несколько факторов ограничивают пока их использование за пределами лабораторий. Более того, SSD, порой, предназначаются для помощи слепым без внимательного учета их мнений, вкладов личного «опыта болезни» и сотрудничества с медициной, будучи проверенными только на гетерогенных популяциях людей с поздним началом инвалидности или, наоборот, врожденно слепых. Это, очевидно, влияет на результаты исследований.

Слепота — один из тяжелейших видов инвалидности. В этом обзоре мы представили две популярные концепции реабилитации. Первая концепция — это сенсорная замена, которая заключается в использовании другой сенсорной модальности для выполнения задачи, обычно выполняемой зрением. Вторая концепция — это кросс-модальная пластичность, которая возникает, когда потеря входных данных в одной сенсорной модальности приводит к реорганизации представления в мозге других сенсорных модальностей. Для обоих вариантов нужны тренировки. В настоящее время в полной мере признано, что действительно, слепые могут развить даже сенсорные способности, превлходящие нормальные за счет гипертренировки в других модальностях.

Мы упомянули ряд важных факторов, которые могут повлиять на то, как SSD используются заинтересованными пользователями, естественно небезразличными к важным обстоятельствам собственной жизни. Скромный масштаб реального использования пока не соответствует значимости технологии и её потенциальным возможностям. Ситуация должна быть и, несомненно, будет исправлена. Цель трудна, но достижима и соответствует задачам медицины: приобщить к приемлемой жизни обделенных судьбой людей.

### Литература

(п.п. 1–10; 12–19 см. References)

11. Лобанов Е.В. Эволюция понятия «остеоинтеграция» и обзор особенностей современных зубных имплантов, влияющих на остеоинтеграцию. *Патогенез*. 2023; 21(1): 16-21.

20. Ершов А.В., Литвицкий П.Ф., Тушова К.А. Особенности механизма развития и течения острого инсульта у пациентов с covid-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(3): 13-7.

### References

1. Shin-ichi Iwasaki. Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. *J Anat*. 2002. PMID: 12171472 Free PMC article. Review.
2. Bach-Y-Rita P., Collins C.C., Saunders F.A., White B., Scadden L. Vision substitution by tactile image projection. *Nature*. 1969; Mar 8; 221(5184): 963-4.
3. Bach-y-Rita P. *Brain Mechanisms in Sensory Substitution*. Cambridge: 1972. Academic Press Inc.
4. P A Price, B W Darvell. Force and mobility in the ageing human tongue. *Med J Aust*. 1981; Jan 24;1(2) 75-8
5. Taek Park, Youngsun Kim, Effects of tongue pressing effortful swallow in older healthy individuals, Archives of Gerontology and Geriatrics, 10.1016/j.archger.2016; 05.009, 66, 127-133
6. Ahmad Alghadir, Hamayun Zafar, S.L. Whitney, Zaheen Iqbal. Effect of chewing on postural stability during quiet standing in healthy young males. *Somatosensory Mot. Res*. 2015; 32(2): 72-6.
7. Kathleen H Sienko, Rachael D Seidler 2, Wendy J Carender 3, Adam D Goodworth 4, Susan L Whitney 5, Robert J Peterka. Potential Mechanisms of Sensory Augmentation Systems on Human Balance Control. *Front Neurol*. 2018; Nov 12; 9: 944.
8. Thieme H., Morkisch N., Mehrholz J., Pohl M., Behrens J., et al. Mirror therapy for improving motor function after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 7(7): CD008449.
9. Broderick P., Horgan F., Blake C., Ehrensberger M., Simpson D., Monaghan K. Mirror therapy for improving lower limb motor function and mobility after stroke: A systematic review and meta-analysis. *Gait Posture*. 2018; Jun; 63: 208-20.
10. Meng Liu, Xiting Wang 1, Fengzhi Wu 1, Ning Dai 1, Mindan Chen 1, Jiaojiao Yu et al. Variations of Oral Microbiome in Chronic Insomnia Patients with Different Tongue Features. *Am J Chin Med*. 2020; 48(4): 923-44.
11. Lobanov E.V. Evolution of the concept of “osseointegration” and a review of the features of modern dental implants affecting osseointegration. *Patogenez*. 2023; 21(1): 16-21.
12. H Koshino, T Hirai, T Ishijima, Y Ikeda. Tongue motor skills and masticatory performance in adult dentates, elderly dentates, and complete denture wearers. *J Prosthet Dent*. 1997; Feb; 77(2): 147-52
13. Tyler S Allison 1, Joel Moritz Jr 2 3, Philip Turk 4, Leslie M Stone-Roy. Lingual electro tactile discrimination ability is associated with the presence of specific connective tissue structures (papillae) on the tongue surface. *PLoS One*. 2020; Aug 7; 15(8):e0237142
14. Ahmad H Alghadir, Hamayun Zafar, Zaheen A Iqbal. Effect of tongue position on postural stability during quiet standing in healthy young males. *Somatosens Mot Res*. 2015; 32(3): 183-6.
15. Gha Yeon Park, Hyeyeong Hwang, Myunghwan Choi. Advances in Optical Tools to Study Taste Sensation Mol Cells. 2022; Dec 31; 45(12): 877-82.
16. Denis Diderot: A Letter on the Blind for the Use of Those Who See, 1749.

17. Maurice Ptito, Maxime Bleau, Ismaël Djerourou, Samuel Paré, Fabien C. Schneider, and Daniel-Robert Chebat. Brain-Machine Interfaces to Assist the Blind. *Front Hum Neurosci.* 2021; 15: 638887.
18. Kaczmarek K.A. The tongue display unit TDU for electrotactile spatiotemporal pattern presentation. *Sci Iran D Comput Sci Eng Electr Eng.* 2011; 18(6): 1476–85.
19. Shvadron, Adi Snir, Amber Maimon, Or Yizhar, Sapir Harel, Keinan Poradosu et al Shape detection beyond the visual field using a visual-to-auditory sensory augmentation device. *Front Hum Neurosci.* 2023; 17: 1058617.
20. Ershov A.V., Litvitsky P.F., Tushova K. A. Features of the mechanism of development and course of acute stroke in patients with covid-19. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(3): 13-7.

**Сведения об авторах:**

**Пальцын Александр Александрович**, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП;

**Свиридкина Надежда Борисовна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., ФГБУН НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Зайченко Д.М.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1</sup>, Москалев А.А.<sup>4</sup>, Московцев А.А.<sup>1,2,3</sup>

## Стресс эндоплазматического ретикулума, внеклеточный протеостаз и врожденный иммунитет в патогенезе возрастзависимых заболеваний: болезнь Альцгеймера

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1;

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

<sup>4</sup>Российский геронтологический научно-клинический центр ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 129226, Москва, Россия, ул. 1-я Леонова, д. 16

Адаптивный потенциал и выживаемость клеток в стрессовых условиях зависят от их способности контролировать нативное состояние белков – поддерживать внутриклеточный и внеклеточный протеостаз. Это достигается экспрессией целого ряда проадаптивных генов – шаперонов, компонентов системы белковой деградации и др. При болезни Альцгеймера накопление и агрегация бета-амилоида во внеклеточном пространстве, а также внутриклеточная конденсация белка tau нарушают протеостаз. В ответ на это запускается сложный комплекс реакций, включающий в себя клеточный стрессовый ответ, пути врожденного иммунитета. Хронизация клеточного стресса приводит к развитию в клетках фенотипа стресс-индуцированного старения и запуску провоспалительных реакций, что еще в большей степени повреждает ткань. В обзоре обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе нарушений протеостаза при болезни Альцгеймера, а также реакции компенсации – клеточные ответы на несвернутые белки, участие внеклеточных шаперонов, фагоцитарная активность микроглии, функционирование глимфатической системы. Рассматривается развитие протеотоксического стресса с активацией врожденного иммунитета и клеточного старения. Болезнь Альцгеймера является характерным примером возраст-ассоциированного заболевания, где перечисленные процессы пересекаются и разворачиваются в динамике, определяемой генетическими особенностями организма и внешними факторами. Схожие патогенетические механизмы могут иметь место в целом ряде возрастзависимых заболеваний.

**Ключевые слова:** стресс эндоплазматического ретикулума; нейродегенеративные заболевания; болезнь Альцгеймера; шапероны; амилоид; неупорядоченные белки

**Для цитирования:** Зайченко Д.М., Кубатиев А.А., Москалев А.А., Московцев А.А. Стресс эндоплазматического ретикулума, внеклеточный протеостаз и врожденный иммунитет в патогенезе возрастзависимых заболеваний: болезнь Альцгеймера. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 93-102.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.93-102

**Участие авторов:** Московцев А.А., Зайченко Д.М. – концепция обзора, отбор публикаций, критический пересмотр, написание статьи, редактирование текста, утверждение окончательного варианта рукописи, оформление рукописи для публикации; Москалев А.А., Кубатиев А.А. – обзор публикаций, критический пересмотр и редактирование текста. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Зайченко Данила Михайлович, e-mail: danilamihailovich@mail.ru

**Финансирование.** Грант Российского научного фонда № 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.10.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Zaichenko D.M.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1</sup>, Moskaev A.A.<sup>4</sup>, Moskovtsev A.A.<sup>1,2,3</sup>**Endoplasmic reticulum stress, control of extracellular proteostasis, and innate immunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease**<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Barrikadnaya St. 2/1, Moscow 125993, Russian Federation;<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitaynova St. 1, Moscow, Russian Federation;<sup>4</sup>Laboratory of Epigenetics and Genetics of Aging, Russian Gerontological Research and Clinical Center at the Pirogov Russian National Research Medical University,1<sup>st</sup> Leonova St. 16, Moscow, 129226, Russian Federation

The adaptive potential and survival of cells under stressful conditions depend on their ability to control the native state of proteins, i.e., to maintain intracellular and extracellular proteostasis. This is achieved through the expression of pro-adaptive genes, including chaperones, components of the protein degradation system, etc. In Alzheimer's disease, the accumulation and aggregation of beta-amyloid in the extracellular space, as well as intracellular condensation of tau protein, impair proteostasis. In response to the disruption of proteostasis, a complex set of responses is initiated, including the cellular stress response and innate immune pathways. Chronification of cellular stress leads to the development of a stress-induced cellular senescence phenotype and initiation of proinflammatory reactions that further damage tissues. This review describes possible mechanisms underlying disturbances in proteostasis in Alzheimer's disease, as well as compensatory reactions, such as cellular responses to unfolded proteins, the participation of extracellular chaperones, phagocytic activity of microglia, and the functioning of the glymphatic system. The development of proteotoxic stress with activation of innate immunity and cellular senescence is also considered. Alzheimer's disease is a typical example of an age-associated disease, in which the listed processes intersect and develop dynamically as determined by genetics and by external factors. Similar pathogenetic mechanisms can also manifest themselves in a number of age-associated diseases.

**Keywords:** endoplasmic reticulum stress; neurodegenerative diseases; Alzheimer's disease; chaperones; amyloid; disordered proteins

**For citation:** Zaichenko D.M., Kubatiev A.A., Moskaev A.A., Moskovtsev A.A. Endoplasmic reticulum stress, control of extracellular proteostasis, and innate immunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 93-102. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.93-102

**Author's contribution:** Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M. – concept of the review, selection of publications, critical revision and writing of the article, text editing, approval of the final version of the manuscript for publication, design of the manuscript for publication; Moskaev A.A., Kubatiev A.A. – review of publications, critical revision and editing of the text. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** *Danila M. Zaichenko*, e-mail: danilamihailovich@mail.ru

**Financing.** The work was supported by the Russian Science Foundation, Grant № 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820>

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

**Information about the authors:**Moskovtsev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-824X>Zaichenko D.M., <https://orcid.org/0000-0003-0241-0065>Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>Moskaev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3248-1633>

Received 10.10.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

Гомеостаз — основополагающая особенность живых систем. Поддержание постоянных условий в клетке и соответствующее снижение энтропии в условиях открытой системы способствуют упорядоченному протеканию внутриклеточных процессов. Это минимизирует число ошибок при кодировании и декодировании сенсорной и наследственной информации, а также при ее передаче дочерним клеткам. Гомеостаз клетки обе-

спечивается системами, компенсирующими сравнительно небольшие изменения микроокружения, и такое динамическое равновесие характерно для функционирования клетки в физиологических условиях.

При действии различных неблагоприятных факторов клетка может увеличивать буферную емкость гомеостатических систем — эта неспецифическая реакция на изменение условий, реализуемая через усиле-

ние экспрессии целого ряда генов, является основой клеточного стрессового ответа. Если какое-либо изменение параметра микроокружения по амплитуде или скорости все же превышает буферную емкость поддерживающих гомеостаз клеточных систем, клеточные элементы могут повреждаться. Однако даже в такой ситуации клетка может задействовать альтернативные адаптивные пути, такие, как аутофагия, и может обеспечить этим свое выживание.

Индукторами клеточного стресса могут выступать органические и неорганические химические вещества, физические воздействия и другие факторы, а начальный клеточный ответ на них обладает ярко выраженными схожими закономерностями. При стрессе происходит существенная перестройка программы генной экспрессии, изменяется клеточный транскриптом и протеом.

Одним из наиболее изученных на настоящий момент видов клеточного стресса является стресс эндоплазматического ретикула [1]. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) является клеточной органеллой, в которой проходит синтез, сворачивание, посттрансляционные модификации белков. Для клеточного гомеостаза ЭПР является своеобразной «узловой станцией», через которую реализуется генетическая информация и поддерживается баланс части белковых элементов клетки и внеклеточного пространства. При индуцированном химическими, физическими или биологическими факторами нарушении процесса сворачивания, или конформационного созревания, белки могут стать причиной развития протеотоксического стресса [2], интенсивность которого определяется скоростью синтеза и обновления белков. Несвернутые полипептидные цепочки в результате незаконченной трансляции, белки в стадии неполного фолдинга с нарушенной конформацией, а также белковые субъединицы, не вошедшие в состав комплексов, могут формировать дополнительные интерфейсы для межмолекулярных взаимодействий. Это может приводить к белковой агрегации, формированию токсичных и иммуногенных продуктов. Накопление неправильно свернутых белков или белков, не закончивших сворачивание в люмене ЭПР, может влиять на функции и состав этого компартмента, тем самым индуцируя состояние, характеризующееся как стресс эндоплазматического ретикула (endoplasmic reticulum stress или ER stress).

Причинами стресса ЭПР могут быть различные факторы, например, нарушение аминокислотного или энергетического баланса, недостаток ионов кальция, гипоксия, химические токсины. При возникновении стресса ЭПР в качестве реакции клетки запускается ответ на белки с ненативными конформациями (Unfolded

Protein Response, UPR) [1,2], направленный на восстановление клеточного гомеостаза посредством повторного сворачивания неправильно свернутых белков и/или их деградации. Если количество поврежденного белка превышает восстановительные возможности клетки, то включаются механизмы апоптоза.

В норме экспрессия генетической информации сопровождается ошибками на каждом этапе – так, ошибки РНК-полимераз, сплайсинга, трансляции могут приводить к синтезу дефектных биополимеров. Клетки могут быть толерантны к таким ошибкам в силу сравнительно короткого времени жизни мРНК и белков, и это может даже способствовать большей фенотипической вариабельности. Тем не менее, цена таких ошибок в стрессовых условиях может оказаться высокой и не способствовать выживанию клеток.

Фолдинг, или сворачивание, является одним из наиболее чувствительных к условиям и подверженных ошибкам этапов синтеза белка в связи с участием в этом процессе относительно слабых нековалентных связей. Эффективность сворачивания в секреторном пути зависит от конкретного белка, но в целом далека от абсолютной – так, по одной из оценок, она составляет не более 20% [3]. Доля белковых продуктов, не достигающих правильной зрелой конформации из-за ошибок трансляции и посттрансляционных процессов, может составлять более 30% от общего числа вновь синтезированных аминокислотных цепей [4]. В некоторых работах сообщается о значительно меньшем значении несворачиваемых белков [5].

У высших эукариот, как элемент ответа на белок с ненативной конформацией (UPR), активируется блок трансляции, опосредуемой киназой PERK за счет снижения кеп-зависимой трансляции. Это снижает нагрузку на синтезирующий белок аппарат клетки. Также при стрессе ЭПР происходит активация ядерного транскрипционного фактора ATF6. После его транслокации в ядро начинается усиленная выработка шаперонов ЭПР, способствующих восстановлению протеостаза этой органеллы. Кроме этого, почти у всех эукариот при стрессе ЭПР имеет место сплайсосома-независимый цитоплазматический сплайсинг, опосредуемый киназой-эндорибонуклеазой IRE1, в результате чего синтезируется еще один транскрипционный фактор XBP1s [1]. Эти базовые механизмы первоначально направлены на синтез шаперонов, компонентов системы белковой деградации, антиоксидантной защиты, однако, при длительном стрессе эти же сигнальные пути могут активировать клеточную гибель.

Стрессовое состояние клетки может завершаться возвращением к нормальному функционированию или

запуском апоптоза, однако, этим не исчерпываются сценарии дальнейшей клеточной «судьбы». Накапливающиеся данные свидетельствуют о критической значимости для патогенеза широкого спектра заболеваний стресс-индуцированного преждевременного старения (Stress-Induced Premature Senescence/SIPS), которое может развиваться при хроническом стрессе ЭПР [6].

ЭПР – органелла, участвующая в механизме «принятия решения» об адаптивном, проапоптотическом или сенесцентном постстрессорных сценариях для клетки. Ответ на белки с ненативными конформациями (UPR) играет фундаментальную роль в контроле качества белковых конформаций, в предотвращении их агрегации как внутри клетки, так и во внеклеточном пространстве, в связи с чем этот механизм вовлечен в развитие широкого спектра заболеваний – сердечно-сосудистых, метаболических, нейродегенеративных. В последнее время предлагается ряд перспективных терапевтических подходов по влиянию на компоненты UPR и другие стресс-ассоциированные компоненты [7].

Одним из распространенных нейродегенеративных заболеваний, центральным звеном патогенеза которого предполагается дисбаланс протеостаза, является болезнь Альцгеймера (БА) – мультифакториальное заболевание, как спорадическое, так и генетическое [8]. Развитие болезни сопровождается прогрессирующим снижением памяти и мыслительных способностей [9]. Возраст является наиболее важным фактором риска БА [8] – большинство случаев регистрируется после 65 лет (поздний дебют), и только 5% в более раннем возрасте (ранний дебют) [10]. Среди других негенетических факторов различают травмы головы, сосудистые заболевания, инфекции, факторы внешней среды такие, как тяжелые металлы и др. [11]. 1-2% случаев БА представляют собой аутосомно-доминантно наследуемые с ранним дебютом [9], мутации в генах белка-предшественника амилоида (APP), пресенилина1 (PSEN1), пресенилина2 (PSEN2) встречаются в большинстве таких случаев, но, кроме того, существуют также полностью пенетрантные генетические варианты, такие, как аллельный полиморфизм гена аполипопротеина E (APOE) [8]. Интересно, что редкая мутация в гене *APP A673T* была показана как протективная для БА [12]. Следует также подчеркнуть, что хотя БА наиболее частая причина деменции, последняя может быть вызвана многими нейродегенеративными или цереброваскулярными патологиями, особенно у пожилых людей – таким образом, эпидемиология БА тесно переплетена с другими причинами деменции [8].

Ключевые нейропатологические признаки БА можно разбить на 2 группы – «позитивные» и «негатив-

ные» поражения. Первые включают в себя амилоидные бляшки, церебральную амилоидную ангиопатию, нейрофибриллярные образования, ответы глиальных клеток; вторые – потерю нейронов и синапсов [13].

Обнаруженные немецким неврологом и психиатром Алоисом Альцгеймером морфологические изменения, связанные с деменцией, (амилоидные бляшки, нейрофибриллярные образования) – во многом определили исходное направление исследований заболевания, названного его именем. На настоящий момент существует несколько гипотез патогенеза БА, но общий консенсус все еще отсутствует. В 1970-х годах была предложена холинергическая гипотеза, которая связывала обнаруживаемую при деменции холинергическую недостаточность с ацетилтрансферазой, синтезирующей ацетилхолин в цитоплазме холинергических нейронов из холина и ацетил-коэнзима А [11]. Ацетилхолин вовлечен в критические функции мозга – запоминание, обучение и обработку сенсорной информации. Дегенерация холинергических нейронов при БА обуславливает изменения когнитивных функций и потерю памяти, при этом считается, что амилоид нарушает холинергическую передачу, в том числе через снижение захвата холина и высвобождения ацетилхолина [11].

Доминирующей по числу сторонников гипотезой патогенеза БА в настоящее время является амилоидная – каскадное накопление внеклеточных белковых включений-агрегатов в виде  $\beta$ -складчатых листов. Последнее было предложено в 1992 году как инициализирующий патогенез БА процесс, приводящий к накоплению белка tau (тау), потере нейронов и синапсов и снижению когнитивных функций [9, 14]. Внеклеточные агрегаты  $\beta$ -амилоида вызывают нарушение баланса внеклеточного протеостаза.

Амилоидные бляшки считаются результатом агрегации пептидов бета-амилоида, образующихся в результате последовательного расщепления в эндосомах белка-предшественника  $\beta$ -амилоида APP бета-секретазой (BASE1) до секретируемого фрагмента APP- $\beta$  и мембраносвязанного фрагмента C99. Последний связывается и процессируется гамма-секретазным белковым комплексом до высвобождаемого C-концевого фрагмента (CTF) и остающегося пептида A $\beta$ 48 [9], который расщепляется с высвобождением A $\beta$  пептидов длиной 42, 40, 38 аминокислот. Так как расщепление до пептидов проходит внутри мембраны, можно предположить, что вариации физико-химических условий, например, текучести мембраны из-за переменного содержания холестерина, меняют ее свойства и могут влиять на это расщепление. Пептиды-продукты расщепления из эндосом в конечном итоге секретируют-

ся во внеклеточное пространство, при этом синаптическая передача способствует этой секреции. Гамма-секретазный комплекс состоит из четырех белковых субъединиц: пресенилин (PSEN), усилитель пресенилина (PEN), APH, и никастрин; существует несколько субъединиц, например, PSEN1/ PSEN2, и до четырех различных комплексов может существовать в одной клетке [9, 15]. Гамма-секретазный комплекс ответствен за ряд генетических форм БА.

A $\beta$  пептиды склонны к агрегации в олигомеры, протофибриллы и фибриллы с конформацией в виде  $\beta$ -складчатого листа, при этом именно A $\beta$ 42 пептиды вследствие более длинного гидрофобного хвоста наиболее подвержены агрегации [9]. Однако, наиболее токсичными формами могут быть именно олигомеры, и агрегация может рассматриваться как в какой-то мере защищающий нервную ткань процесс, «упаковывающий» эти олигомеры в сравнительно нетоксичные и статичные комплексы. При этом стоит учитывать пертурбацию этими комплексами тока интерстициальной жидкости, роль которой описывается ниже.

Инициация агрегации, или нуклеация, и начальный рост агрегата могут быть важными процессами, определяющими порог, после которого экспансия комплекса становится необратимой. Действительно, механизмы дезагрегации, действующие как минимум внутриклеточно, могут замедлить рост комплексов. Образование A $\beta$  фибрилл может начинаться с нуклеации небольших неправильно свернутых  $\beta$ -складчатых A $\beta$  пептидов по аналогии с прионами [16]. Инъекции в APP-трансгенных мышей экстрактов мозга с небольшим количеством неправильно свернутого амилоида  $\beta$  индуцировали амилоидоз мозга [9, 17]. Некоторые амилоидные патологии способны передаваться от человека к человеку [9].

Следует также отметить данные, свидетельствующие о том, что для агрегации A $\beta$  пептидов необходим их захват микроглией, с последующей внутриклеточной нуклеацией и агрегацией [9, 18]. Интернализация внеклеточных пептидов может указывать на активный протеостатический контроль внеклеточной среды клетками стромы.

Хотя амилоидная гипотеза подтверждается наличием исключительно генетических форм БА, таких, как аутосомно-доминантная форма БА, синдром Дауна (трисомия 21 хромосомы), дупликация локуса APP, при которых наблюдается увеличение соотношения A $\beta$ 42/ A $\beta$ 40, общий рост продукции A $\beta$  и/или их фибриногенных свойств [9,19], ряд фактов указывает на то, что как минимум в случае спорадических форм БА накопление A $\beta$  может быть недостаточно для разви-

тия патологии, и могут быть вовлечены другие факторы, возможно, присоединяющиеся позже. Например, наблюдается всего лишь незначительная корреляция между фазами накопления амилоида и степенью когнитивных нарушений [9,20]. Кроме того, амилоидные бляшки накапливаются и определяются при старении в мозге у здоровых людей без признаков БА [11].

Широкая распространенность амилоидной гипотезы и чрезмерная уверенность в ее справедливости приводила к стремлению исследователей соответствовать в своих исследованиях ее положениям, при этом даже подтасовывать факты. В 2006 г. группа исследователей под руководством Karen Ashe – разработчицы ранее упоминавшейся в этом обзоре трансгенной мышинной модели, производящей человеческий A $\beta$  – опубликовала статью, в которой утверждалось об открытии ранее неизвестного амилоидогенного пептида A $\beta$ \*56 (“amyloid beta star 56”), инъекция которого крысам приводила к ухудшению их способности вспоминать простую, ранее полученную информацию [21]. Эта работа была высоко оценена, в частности, Ashe получила престижную премию Potamkin Prize в том числе и за работу с A $\beta$ \*56, и эти олигомеры были названы «звездными подозреваемыми» в БА [22, 23]. Статья [21] была процитирована 2325 раз и попала в топ 5 наиболее цитируемых работ по БА [23]. Однако, в 2021 г. исследователь в области нейронаук Вандербильского университета Мэтью Шрег (Matthew Schrag), ранее известный публичной критикой спорного одобрения FDA анти-A $\beta$  препарата Aduhelm, начал работу по расследованию возможных нарушений в ходе разработки другого экспериментального препарата, блокирующего образование амилоидных бляшек при БА Simufilam, создателем которого была компания Cassava Sciences [23]. В ходе этого расследования Шрег обнаружил большое количество специально отредактированных авторами изображений в статье [21] и связанных с ней статьях первого автора С. Лесне (Sylvain Lesné) – авторы сделали это для лучшего соответствия гипотезе о токсичных A $\beta$ \*56. Подозрения о модификациях свыше 70 изображений были подтверждены в ходе расследования, проведенного журналом Science [23]. Некоторые эксперты в области БА заявляют, что работа Лесне, как одна из наиболее цитируемых в этом столетии по БА, вела исследования по БА в неверном направлении целых 16 лет. Так, только в 2022 г. Национальный институт здоровья потратил 1.6 млрд долларов (половину от общего финансирования исследований БА!) на проекты по исследованию амилоидов [23]. Ученые, которые исследуют другие потенциальные причины болезни Альцгеймера, такие, как иммунная дисфунк-

ция или воспаление, жалуются, что их отодвинула на второй план «амилоидная мафия». Гипотеза амилоида стала «научным эквивалентом птолемеевской модели Солнечной системы», в которой Солнце и планеты вращаются вокруг Земли [23]. С 14 июля 2022 г. статья [21] сопровождается комментарием редактора, выражающего озабоченность относительно ряда изображений в ней и призывающего с осторожностью относиться к содержащимся в ней данным. С подробностями этой все еще продолжающейся почти детективной истории можно ознакомиться в журнале Science [23].

В отличие от амилоида, другой тип морфологических изменений при БА — нейрофибриллярные образования с участием белка tau — хорошо коррелируют с когнитивными нарушениями [9, 20], а агрегирующий и гиперфосфорилированный белок tau рассматривается как ключевой драйвер нейродегенерации при БА. Кроме того, известен целый ряд заболеваний — таупатий, связанных с нарушениями tau, при которых патологические агрегаты различались изоформами и конформациями этого белка [9]. Функционально tau вовлечен в процессы сборки микротрубочек, стабилизации аксонов, регуляции транспорта, опосредуемого микротрубочками, однако полный спектр его функций до конца не ясен. Мыши с полным нокаутом tau, не экспрессирующие никакие из его изоформ, демонстрируют различные патологические фенотипы в позднем возрасте — когнитивные и моторные нарушения, варьирующие в зависимости от генетических особенностей [24].

Белок tau является внутренне неупорядоченным и экспрессируется в виде 6 изоформ в ЦНС взрослых. Кроме вышеперечисленных, tau взаимодействует с широким кругом макромолекул [24]. Это может быть обусловлено тем, что неупорядоченные белки часто имеют гораздо больше (примерно на порядок) взаимодействующих партнеров, с которыми они связываются с невысокой афинностью. Нейрофибриллярные образования содержат нерастворимые гиперфосфорилированные формы tau, которые агрегируют в  $\beta$ -складчатые амилоидные фибриллы, известные как спаренные спиральные филаменты [25], и демонстрируют также способность распространяться как прионы [9]. Вместе с тем, в нормальном мономерном состоянии tau хорошо растворим и не гидрофобен, что делает крайне актуальным вопрос о том, какое событие инициирует его агрегацию [9].

Известно, что tau подвержен значительным посттрансляционным модификациям (ПТМ) и может быть фосфорилирован по 85 различным аминокислотным остаткам [26]. Гиперфосфорилированный tau перенаправляется из аксонов в тело нейронов [9], а указанные

ПТМ могут также влиять на стабильность этого белка, например, затрудняя его деградацию.

Широкий спектр полианионов стимулирует агрегацию tau *in vitro*, включая гепарин, РНК, полиглутамат и жирные кислоты. Белок tau связывается с отрицательно заряженным концом альфа-тубулина для полимеризации и стабилизации микротрубочек. Из перечисленных полианионов РНК может быть наиболее представленной макромолекулой в нейрональной цитоплазме и наиболее важной для регуляции состояния tau, в ряде работ показано включение определенных мРНК в tau агрегаты [27]. Следует отметить, что существенная часть РНК-связывающих белков является полностью или частично внутренне неупорядоченными. Интересно, что стабилизирующая микротрубочки активность tau находилась под влиянием РНК-гомополимеров, которые блокировали в эксперименте tau-опосредованную сборку микротрубочек [28]. Таким образом, РНК может потенциально напрямую управлять клеточными процессами через регулирующие точки, в качестве которых могут выступать неупорядоченные белки. РНК-связывающий белок MSUT2 контролирует таупатогенные фенотипы нейронов у млекопитающих, а нокаутные по этому белку мыши демонстрируют сниженную аккумуляцию патогенного tau, когнитивные ухудшения и нейродегенерацию [27].

Функциональное значение агрегации tau неизвестно. Это может быть патогенное усиление функции при образовании токсичных форм tau, или нейропротективный процесс, который минимизирует количество растворимых токсичных форм tau, или это может быть комбинация двух процессов, но в любом случае это сопровождается потерей физиологических функций вследствие снижения концентрации tau [27].

При клеточном стрессе и стрессе эндоплазматического ретикулума может иметь место блок кеп-зависимой трансляции. При этом происходит разборка полисом, и концентрация цитоплазматической мРНК, не связанной с полисомами, растет. Высвободившаяся мРНК должна включаться в быстро формирующиеся стрессорные гранулы. В случае, если мРНК не будет своевременно конденсироваться в стрессорные гранулы, можно предположить, что она может инициировать нуклеацию и агрегацию tau. Таким образом, количественный дисбаланс взаимодействующих с tau макромолекул-партнеров, а также изменения вследствие ПТМ характеристик tau, влияющих на процесс фазового разделения жидкость-жидкость (Liquid-liquid phase separation, LLPS), могут быть событиями, инициирующими патологическую агрегацию tau.

В последнее время возрастает внимание к врожденному иммунитету и в целом иммунным реакциям в пато-

генезе БА. Реактивный астроглиоз, или аномальное увеличение количества астроцитов, а также микроглиальные ответы, включающие фагоцитоз, являются важными патофизиологическими процессами в развитии БА [9]. Неудивительно, что целый ряд полиморфизмов и редких кодирующих вариантов в иммунных генах являются факторами риска БА. Эти иммунные гены, которые могут нести полиморфизмы, дифференциально экспрессируются в моделях накопления Аβ по сравнению с таупатиями, что позволило предположить, что эти гены могут относиться к группе генов ответа на амилоид [9].

Микроглиальные клетки могут перемещаться к сайтам накопления амилоида Аβ и фагоцитировать его [29], тем самым способствуя снижению скорости его накопления во внеклеточном пространстве. С другой стороны, поглощение внеклеточного материала будет способствовать активации микроглии и запуску провоспалительных ответов – в особенности когда эти процессы длительно действуют, то есть хронизируются. Фагоцитарная активность микроглии и ее способность утилизировать внеклеточные компоненты имеют предел, и его превышение может приводить к перегрузке эндосомально-лизосомального компартмента, что, в свою очередь, будет все в большей степени мешать клеткам расщеплять свои белки в ходе нормального обновления. Такая блокировка системы деградации белков приводит к дисбалансу всей системы протеостаза и может индуцировать или усугублять стресс эндоплазматического ретикулума, который будет способствовать провоспалительному ответу. При этом, безусловно, стресс ЭПР будет способствовать снижению функциональной активности микроглиальных клеток. Действительно, с поздними стадиями БА ассоциировано ухудшение фагоцитарной способности микроглии [30], что в еще большей степени способствует экспансии агрегатов Аβ. Активация микроглии как звена врожденного иммунитета будет также способствовать включению воспалительных каскадов, а это событие всегда имеет свою цену – нарастающее вследствие воспалительных ответов повреждение ткани стимулирует дальнейшие тяжелые иммунные реакции.

Подтверждением вышесказанному является исследование, в котором показано, что микроглия, подвергшаяся клеточному стрессу под воздействием арсенита натрия или пептидов амилоида Аβ, образует крупные стрессорные гранулы (СГ), в которые рекрутируется тирозинкиназа SYK. SYK способствует дальнейшему росту и образованию СГ, кроме того, она стимулирует выработку активных форм кислорода и азота, токсичных для нейрональных клеток. Эта секвестрация SYK в СГ ингибирует способность клеток микроглии фаго-

цитировать *Escherichia coli* или фибриллы Аβ [31]. Обнаружено также, что сенесцентные («старые») микроглиальные клетки более склонны к образованию СГ, а СГ, содержащие SYK, преобладают в мозге пациентов с тяжелой болезнью Альцгеймера [31].

Интересными являются также сообщения о непрофессиональных фагоцитах в тканях – свыше 21 нормальных тканевых культур, полученных из семи органов, демонстрировали фагоцитарную активность [32], что указывает на то, что поглощение внеклеточных компонентов клетками разных типов может быть важным процессом, влияющим на протеостаз и развитие заболеваний [2]. При удалении гена кальретикулина (*CALR*) – важного участника системы контроля качества белков ЭПР – было показано усиление эндоцитоза при стрессе ЭПР. Предполагается, что усиление эндоцитоза необходимо для удаления дефектных мембранных белков, которые обошли систему контроля конформаций белков, синтезируемых в секреторном пути [33].

Интересно, что профиль экспрессии и функциональные эффекты ряда генов, вовлеченных в фагоцитоз, разнятся в микроглиальных клетках при БА на стадиях накопления амилоида и выраженной таупатии. Так, продукт экспрессирующегося в микроглии гена *TREM2* способствует фагоцитарной активности микроглии, снижает локальную токсичность амилоида, а также нуклеацию tau и распространение tau-агрегатов [9]. Редкий аллельный вариант *TREM2 R47H* ассоциирован с существенно возросшим риском БА [9,34]. У мышей с моделью PS19 таупатии, полное удаление *TREM2* уменьшает tau-опосредуемую нейродегенерацию и астроглиоз [9,35], что указывает на то, что на момент включения таупатии в патогенез БА, микроглия уже может опосредовать скорее токсические эффекты, нежели защитные, то есть она может «переключаться» на провоспалительную активность с повреждающими эффектами.

Таким образом, амилоид способен индуцировать стресс ЭПР в микроглиальных клетках. Показано, что хронический стресс ЭПР вызывает фенотип преждевременного старения фибробластов [6,36]. Хронизация стресса ЭПР может лавинообразно ухудшать течение БА вследствие взаимосвязанных процессов – стресс-индуцированного старения, эскалации иммунных реакций, дисфункции микроглиальных клеток и прогрессирующего «загрязнения» внеклеточного пространства – все эти явления суммируют свои токсические эффекты на нейрональные клетки и индуцируют их гибель, что может вести к развитию деменции.

Критически важно отслеживать динамику агрегации Аβ как в экспериментальных моделях БА, так

и в ходе диагностики с целью раннего выявления БА. Для этого могут применяться как прямые методы детектирования агрегатов Аβ, так и оцениваться скорость снижения пептидов-мономеров из-за их включения в комплексы — например, с использованием электрохимического анализа [37].

Ряд исследователей рассматривает инфекцию как основу развития БА. В мозге больных БА часто определяется вирус герпеса, а амилоид демонстрирует антимикробные свойства и способен подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, блокировать размножение вируса герпеса, причем последний способен самостоятельно инициировать агрегацию амилоида [9]. Интересно, что ряд клинических испытаний препаратов против амилоида был остановлен по причине развития энцефаломиелита. С другой стороны, есть примеры эффективного использования антигерпетической терапии при БА. Важно учитывать и то, что длительные провоспалительные сигналы могут вести к геномной нестабильности, потере контроля над латентными вирусами.

По нашему мнению, если нарабатываемые клеткой продукты, в частности, белки, своевременно не утилизируются, они могут менять свои свойства в результате окисления и иных повреждений. Эти измененные компоненты уже могут восприниматься как чужеродные, что может запускать пути врожденного иммунитета и последующие иммунные реакции, например, через соответствующие PRR-рецепторы (Pattern Recognition Receptors). Кроме избыточного накопления собственных продуктов через синтез, инфекция может даже в большей степени инициировать повреждения компонентов микроокружения. Таким образом, концепции спонтанного накопления и повреждения амилоида и гипотеза инфекционного триггера не выглядят взаимоисключающими, а, скорее, дополняют друг друга и создают условия для индукции стрессового ответа клеток в сочетании с активацией путей врожденного иммунитета. Взаимосвязь между путями ответа на клеточный стресс, в частности, стресс ЭПР, и путями врожденного иммунитета показана рядом авторов, в том числе в недавней работе [38].

Внеклеточное пространство в этом контексте является особым компартментом, контроль за которым сложен и реализуется через использование целого ряда клеточных популяций и специальных механизмов, к которым относится интернализация в клетки его компонентов. Сложность контроля обусловлена сравнительно жесткими условиями, преобладающими во внеклеточном пространстве — высоким уровнем окислителей, действующими механическими силами типа сдвигового напряжения, очень низким уровнем АТФ [39]. Большое

число заболеваний ассоциировано с токсичными неправильно свернутыми формами и агрегацией секретиромых белков во внеклеточном пространстве. Известно 36 белков, способных откладываться в виде амилоида, ассоциированного с заболеваниями [40].

Важным способом контроля протеостаза внеклеточной среды является система «надзора», включающая в себя секретиромые клеткой шапероны, которые предотвращают разворачивание внеклеточных белков и их агрегацию, а также осуществляют перенаправление «плохих» белков к специальным тканям или клеткам (печень, макрофаги), которые осуществляют их деградацию через эндолизосомальный путь [39]. Следует также подчеркнуть, что в свете новых представлений в этих процессах могут участвовать непрофессиональные фагоциты.

Внеклеточные шапероны, как правило, обладают следующими характеристиками: легко секретиромуются из клеток, эффективно связывают ненативные белки, препятствуют их агрегации, способны функционировать в среде с низким уровнем АТФ [39], т.е. эти шапероны, как правило, АТФ-независимы и, по-видимому, функционируют преимущественно путем удержания субстрата как холдазы. Каноническими экстраклеточными шаперонами являются кластерин, гаптоглобин, α2 макроглобулин, αВ кристаллин, казеин и др. Интересно, что шаперонной активностью могут обладать и другие белки, такие, как S100A. При стрессе ЭПР секреция кластерина снижается за счет его ретротранслокации в цитоплазму, где он предположительно способствует протеосомной или аутофагосомной деградации секретиромых белков [39], т.е. фокус его действия смещается из внеклеточного пространства в внутриклеточное, что делает внеклеточную среду менее защищенной. Вместе с тем, ряд резидентных кошаперонов ЭПР, наоборот, секретиромуются при стрессе ЭПР, например, ERdj3/DNAJB11 [41].

Учитывая ключевую значимость внеклеточного протеостаза при БА, неудивительно, что гены, участвующие в его поддержании, в последнее время привлекают пристальное внимание исследователей. Так, внеклеточный шаперон кластерин (CLU) признан новым фактором риска БА, так же как и BIN1, который вовлечен в формирование искривления мембраны и эндоцитоз [11]. Целый ряд эндогенных, химических и фармацевтических шаперонов рассматриваются в качестве перспективных методов терапии БА [11].

Следует отметить, что указанными механизмами контроль внеклеточного протеостаза не исчерпывается. Важное значение имеет гидродинамика интерстициальной жидкости, которая способна в определенной степени «вымывать» «плохие» белки и прочие ненативные или токсичные продукты из внеклеточной среды.

Недавно предложенная концепция глимфатической системы — конвективного потока интерстициальной жидкости вдоль периваскулярных пространств — оказывается важной для БА, так как фактически представляет собой транспортную систему для удаления амилоида  $\beta$  [42]. Интересно, что сон способствует активации глимфатической системы, поэтому депривация сна приводит к ускорению отложения амилоида  $\beta$  и прогрессии БА [9]. Альтернативным объяснением влияния сна на прогрессию БА может служить увеличение метаболической активности нейронов в состоянии бодрствования [9].

В накоплении агрегатов бета-амилоида в головном мозге важную роль играет нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). ГЭБ контролирует поступление А $\beta$  из плазмы в мозг через рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) и удаление А $\beta$  через белок, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP1) [43]. При БА нарушается баланс между поступлением А $\beta$  в мозг и его обратным транспортом из мозга. А $\beta$  изменяет окислительно-восстановительный статус клеток ГЭБ, что модулирует функционирование митохондрий и нарушает барьерную функцию эндотелиальных клеток, в том числе воздействуя на белки плотных контактов [43]. Цитотоксический эффект А $\beta$  и нарушение барьерной функции частично обусловлены взаимодействием мономеров и олигомеров А $\beta$  с RAGE, и в настоящее время разрабатываются методы лечения БА, основанные на модулировании этого взаимодействия или использовании «ловушек» для А $\beta$  [43].

Таким образом, БА является показательным примером возрастассоциированного заболевания, где оказываются тесно связанными целый ряд процессов: клеточный стресс, стрессиндуцированное старение, дисбаланс внеклеточного протеостаза, активация врожденных и приобретенных иммунных реакций. Все они разворачиваются в динамике, определяемой генетической предрасположенностью и внешними факторами. Перечисленные процессы можно отнести к типовым молекулярно-патофизиологическим, так как похожие сценарии задействованы в целом ряде зависимых от возраста заболеваний.

### Литература/References

- Mesitov M.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2013; 4: 97–108.
- Kukharsky M.S., Everett, M.W., Lytkina O.A., Raspopova M.A., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K., et al. Protein Homeostasis Dysregulation in Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Molekuliarnaya Biologiya*. 2022; 56: 1044–56. <https://doi.org/10.31857/S0026898422060143>
- Oakes S.A., Papa F.R. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015; 10: 173–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
- Schubert U., Antón L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000; 404: 770–4. <https://doi.org/10.1038/35008096>
- Hebert D.N., Molinari M. In and out of the ER: Protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological Reviews*, 2007; 87: 1377–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2006>
- Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Kubatiev A.A., Moskovtsev A.A. MicroRNA Biogenesis in Cell Senescence Induced by Chronic Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology*, Pleiades Publishing. 2023; 57: 670–83. <https://doi.org/10.1134/S0026893323040192/METRICS>
- Minamino T., Komuro I., Kitakaze, M. Endoplasmic Reticulum Stress As a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, Lippincott Williams & Wilkins/Hagerstown, MD. 2010; 107: 1071–82. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227819>
- Knopman D.S., Amieva H., Petersen R.C., Chételat G., Holtzman D.M., Hyman B.T. et al. Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021; 7: 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
- Long J.M., Holtzman D.M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, Elsevier Inc. 2019; 179: 312–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Alzheimer, Association, sciencestaff and alzorg. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, John Wiley & Sons, Ltd. 2019; 15: 321–87. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2019.01.010>
- Breijyeh Z., Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 2020; 25. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012; 488: 96. <https://doi.org/10.1038/NATURE11283>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011; 1. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006189>
- Hardy, J.A., Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, NY)*, Science. 1992; 256: 184–5. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1566067>
- Xia W.  $\gamma$ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond. *Neuroscience Letters*, Elsevier. 2019; 701: 162–9. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.02.011>
- Walker L.C., Jucker M. Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Neuro-071714-033828>, Annual Reviews. 2015; 38: 87–103. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-071714-033828>
- Ye L., Fritsch S.K., Schelle J., Obermüller U., Degenhardt K., Kaeser S.A., et al. Persistence of A $\beta$  seeds in APP null mouse brain. *Nature Neuroscience*. 2015; 18:11, Nature Publishing Group. 18: 1559–61. <https://doi.org/10.1038/nn.4117>
- Sosna, J., Philipp, S., Albay, R.I., Reyes-Ruiz, J.M., Baglietto-Vargas, D., LaFerla, F.M., et al. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular*

- Neurodegeneration*, BioMed Central Ltd. 2018; 13: 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13024-018-0244-X/FIGURES/5>
19. Tcw J., Goate A.M. Genetics of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2017; 7: a024539. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A024539>
  20. Nelson P.T., Alafuzoff I., Bigio E.H., Bouras C., Braak H., Cairns N.J., et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012; 71: 362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0B013E31825018F7>
  21. Lesné S., Ming T.K., Kotilinek L., Kaye R., Glabe C.G., Yang A., et al. (2006) A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006 440:7082, *Nature Publishing Group*. 2006; 440: 352–7. <https://doi.org/10.1038/nature04533>
  22. Morris R., Mucke L. A needle from the haystack. *Nature* 2006 440:7082, *Nature Publishing Group*. 2006; 440: 284–5. <https://doi.org/10.1038/440284a>
  23. Piller C. Blots on a field? *Science*, American Association for the Advancement of Science. 2022; 377: 358–63. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADD9993>
  24. Limorenko G., Lashuel H.A. Revisiting the grammar of Tau aggregation and pathology formation: how new insights from brain pathology are shaping how we study and target Tauopathies. *Chemical Society Reviews*, The Royal Society of Chemistry. 2022; 51: 513–65. <https://doi.org/10.1039/D1CS00127B>
  25. Mandelkow E., Von Bergen M., Biernat J., Mandelkow E.M. Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, John Wiley & Sons, Ltd. 2007; 17: 83–90. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2007.00053.X>
  26. Guo T., Noble W., Hanger, D.P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*. Springer. 2017; 133: 665–704. <https://doi.org/10.1007/S00401-017-1707-9>
  27. McMillan P.J., Benbow S.J., Uhrich R., Saxton A., Baum M., Strovast T., et al. Tau–RNA complexes inhibit microtubule polymerization and drive disease-relevant conformation change. *Brain*, Oxford University Press. 2023; 146: 3206. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAD032>
  28. Bryan J., Nagle B.W., Doenges K.H. Inhibition of tubulin assembly by RNA and other polyanions: evidence for a required protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences. 1975; 72: 3570. <https://doi.org/10.1073/PNAS.72.9.3570>
  29. Solito, E., Sastre M. Microglia function in Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, Frontiers. 2012; 3 FEB, 18823. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2012.00014/BIBTEX>
  30. Krabbe G., Halle A., Matyash V., Rinnenthal J.L., Eom G.D., Bernhardt U., et al. Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLOS ONE*, Public Library of Science. 2013; 8: e60921. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060921>
  31. Ghosh S., Geahlen R.L. Stress Granules Modulate SYK to Cause Microglial Cell Dysfunction in Alzheimer's Disease. *EBioMedicine*, Elsevier B.V. 2015; 2: 1785–98. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.053>
  32. Seeberg J.C., Loibl M., Moser F., Schwegler M., Büttner-Herold M., Daniel C., et al. Non-professional phagocytosis: a general feature of normal tissue cells. *Scientific Reports* 2019 9:1, *Nature Publishing Group*. 2019; 9: 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48370-3>
  33. Massaelli H., Viswanathan D., Pillai D.G., Mesaeli N. (2019) Endoplasmic reticulum stress enhances endocytosis in calreticulin deficient cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, Elsevier. 2019; 1866, 727–36. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.12.003>
  34. Gratuze M., Leyns C.E.G., Holtzman D.M. (2018) New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2018; 13:1, *BioMed Central*. 13, 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13024-018-0298-9>
  35. Sayed F.A., Telpoukhovskaia M., Kodama L., Li Y., Zhou Y., Le D., et al. Differential effects of partial and complete loss of TREM2 on microglial injury response and tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences. 2019; 115: 10172–7. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1811411115/SUPPL\\_FILE/PNAS.1811411115.SM02.GIF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1811411115/SUPPL_FILE/PNAS.1811411115.SM02.GIF)
  36. Zaichenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev, A.A. Phenotypic changes in fibroblasts and RNA metabolism during cellular aging induced by chronic endoplasmic reticulum stress. *Receptors and Intracellular Signaling Collection of Articles from the International Conference*, 2019; 2: 552–8.
  37. Suprun E.V., Radko S.P., Kozin S.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A. Electrochemical Analysis in Studying  $\beta$ -Amyloid Aggregation. *Biochemistry (Moscow)*, Springer. 2023; 88: S88–104. <https://doi.org/10.1134/S0006297923140067/METRICS>
  38. Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Sukhanova I.F., Sokolovskaya A.A., Kozhevnikova L.M. Lipopolysaccharides increase the IRE1-mediated unfolded protein response signaling induced by homocysteine in endotheliocytes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2022; 66: 5–18.
  39. Mesgarzadeh J.S., Buxbaum J.N., Luke Wiseman, R. Stress-responsive regulation of extracellular proteostasis. *Journal of Cell Biology*, Rockefeller University Press. 2022; 221. <https://doi.org/10.1083/JCB.202112104/213026>
  40. Benson M.D., Buxbaum J.N., Eisenberg D.S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Sekijima Y., et al. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, Amyloid. 2020; 27, 217–22. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>
  41. Genereux J.C., Qu, S., Zhou, M., Ryno, L.M., Wang, S., Shoulders, M.D., et al. Unfolded protein response-induced ERdj3 secretion links ER stress to extracellular proteostasis. *The EMBO Journal*, John Wiley & Sons, Ltd. 2015; 34: 4–19. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201488896>
  42. Mestre H., Mori Y., Nedergaard M. The Brain's Glymphatic System: Current Controversies. *Trends in Neurosciences*, Elsevier Ltd. 2020; 43: 458–66. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.04.003>
  43. Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Makarov, A.A. (2023) Effect of  $\beta$ -amyloid on blood-brain barrier properties and function. *Biophys Rev*. 2023; 15: 183–97. <https://doi.org/10.1007/S12551-023-01052-X>

**Сведения об авторах:**

**Зайченко Данила Михайлович**, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП;

**Московцев Алексей Александрович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., руководитель группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП; доцент кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; доцент кафедры общей и клеточной биологии ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru;

**Москалев Алексей Александрович**, доктор биол. наук, член-корр. РАН, зав. лаб. эпигенетики и генетики старения Российского геронтологического научно-клинического центра ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

**Кубатиев Аслан Амирханович**, доктор мед. наук, акад. РАН, научный руководитель ФГБНУ НИИОПП.

## Хроника

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

### Новые механизмы и тренды изучения патологических процессов (Информация о IX Конгрессе Международного общества по патофизиологии – ISP2023)

С 4 по 6 июля 2023 г. в столице Сербии Белграде состоялся очередной IX Всемирный конгресс по патофизиологии (ISP 2023). Первоначально планировалось проведение конгресса в 2022 г. в Москве, на базе Сеченовского университета, но пандемия COVID-19, а затем усложнившаяся международная обстановка нарушили эти планы, и решением Президиума международного общества по патофизиологии проведение конгресса было перенесено в г. Белград.

В настоящее время Международное общество по патофизиологии (МОП) объединяет ученых и специалистов из 53 стран. В работе конгресса приняли участие более 200 делегатов патофизиологического сообщества 22 стран практически со всех континентов мира. Участие приняли патофизиологи из США и Канады, Катара и Саудовской Аравии, Таджикистана и Армении, Японии и Новой Зеландии, наибольшим числом участников была представлена Европа (15 стран). Помимо пленарных заседаний было организовано 16 симпозиумов и 2 стендовых сессии конгресса.

В сборнике материалов конгресса [1] опубликованы 150 представленных участниками работ, включая тезисы 76 устных и 72 постерных сообщения, состоявшихся в ходе пленарных заседаний.

Следует отметить широкое представительство на конгрессе делегации России. В ее составе были патофизиологи Москвы, Санкт-Петербурга, Томска, Уфы, Екатеринбургa, Крыма и ряда других регионов. Российскими делегатами фактически было организовано 3 симпозиума, на которых отечественными учеными было представлено 12 устных сообщений. Всего российскими учеными было сделано на конгрессе 30 устных докладов. К сожалению, помимо россиян, в работе конгресса приняли участие лишь двое представителей стран, ранее входивших в СССР: из Армении и Таджикистана.

Научная программа Конгресса отражала ведущие направления современной патофизиологии, растущее внимание патофизиологов к использованию клеточных, молекулярных и генетических подходов в научных исследованиях.

Всего на конгрессе состоялось пять пленарных заседаний, на которых было заслушано пять пленарных лекций и ряд постерных сообщений. Первая пленарная лекция на конгрессе была представлена экс-президентом МОП Ольгой Пехановой (Olga Pechanova, Словакия) и была посвящена сравнению эффективности использования таргетной терапии и насыщенных полифенольных продуктов природного происхождения при экспериментальном метаболическом синдроме. Подчеркивалось, что оба вида терапии с использованием статинов и полифенольных продуктов снижают уровень оксидативного стресса и нормализуют липидный профиль, но симвастатин, в отличие от полифенолов, не влияет на активность NO-синтетазы.

Интересная пленарная лекция была прочитана профессором Н. Дхала (N. Dhalla, Канада). В исследовании рассмотрены молекулярные механизмы повреждения сердца при ишемии и роль нарушения адренергической регуляции в развитии сердечной недостаточности. В лекции была обоснована важная роль потери адренергической регуляции в связи со снижением чувствительности  $\beta_1$ -адренергических рецепторов и рассмотрены особенности метаболических изменений с увеличением экспрессии регуляторных Gi-протеинов и снижением уровня Gs-белков.

Большой интерес вызвала лекция М. Крефт и соавт. (M. Kreft, Словения), посвященная рассмотрению ранее малоизученных механизмов повреждения энергетического метаболизма мозга и, в частности, астроцитов. Показано, что метаболическая пластичность во многом связана с реактивацией астроцитов. Отмечено, что физиологические и патологические свойства метаболической пластичности астроцитов несут трансляционный потенциал в определении новых потенциальных диагностических биомаркеров и новых терапевтических целей для торможения развития нейродегенеративных процессов и возрастных дисфункций головного мозга, в том числе, при болезни Альцгеймера.

Пленарная лекция Л. Киршенбаум и соавт. (Kirshenbaum L.A., Канада) была посвящена изуче-

нию участия цитокиновых механизмов в формировании доксорубициновой кардиомиопатии. Авторами изучалась роль фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) в сердечной дисфункции, связанной с доксорубицином (DOX). Обозначена новая сигнальная ось, которая функционально связывает кардиотоксические эффекты DOX с протеасомной деградацией TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2). Показано, что нарушение критического пути выживания TRAF2 под действием DOX повышает чувствительность кардиальных миоцитов к TNF $\alpha$ -опосредованной некротической гибели клеток и кардиотоксичности DOX.

Заключительная пленарная лекция авторского коллектива хозяев конгресса (Д. Джурич и соавт., D. Djurich, Сербия) была посвящена изучению роли витаминов, связанных с обменом гомоцистеина. Показано, что гипергомоцистеинемия может повреждать эндотелий и стенки кровеносных сосудов, отягощая течение атеросклеротического процесса, оказывая негативное влияние на механизмы, лежащие в основе инфаркта миокарда и сердечной недостаточности, такие как окислительный стресс, воспаление и изменение функции газотрансмиттеров. Использование витамина B<sub>6</sub>, нормализующего метаболизм гомоцистеина, приводило к снижению окислительного стресса и воспаления, нормализации функции газотрансмиттеров, а также способствовало вазодилатации и улучшению коронарного кровотока в эксперименте.

Отметим, что Российское научное общество патофизиологов, при активном участии профессоров С.Б. Болевича (Сеченовский университет), А.В. Кубышкина (Крымский федеральный университет) и Л.П. Чурилова (Санкт-Петербургский государственный университет) фактически выступило организатором трех симпозиумов, два из которых были посвящены такой актуальной проблеме как патогенез и последствия коронавирусной инфекции («COVID-19 – Epidemiological Alert – Where we now?» и «COVID-19 – Learning from Experience»), еще один симпозиум был посвящён рассмотрению механизмов воспаления и иммунопатологических процессов («Immunity & Inflammation – From basic Research to Clinical Application»). На одном из симпозиумов по изучению COVID-19, большой интерес вызвал доклад Л.И. Бурячковой (Россия), рассматривавший нарушения функции тромбоцитов при коронавирусной инфекции и влияние выявленных нарушений на течение постковидного синдрома. Отметим также сообщение Л.П. Чурилова (Россия) по исследованию влияния антигенной мимикрии белков коронавирусов и аутоантигенов человека при постковидных аутоиммунных поражениях эндокринных же-

лез. На секции по воспалению и иммунитету, привлёк внимание доклад А.В. Кубышкина, И.И. Фомочкиной (Россия), посвященный изучению роли неспецифических протеиназ и их ингибиторов при системных и локальных патологических процессах. Предложена классификация реакций в протеиназ-ингибиторной системе на системном и локальном уровне, представлена классификация шоковых состояний, основанная на особенностях развития синдрома системной воспалительной реакции.

Довольно много внимания на конгрессе было уделено научным исследованиям, посвященным патологии сердца и заболеваниям нервной системы. Интересные доклады состоялись на симпозиумах по изучению кардиоваскулярной протекции и терапии (сопредседатели Taskin Guven E., Turkey, Tipparaju S., USA), по новым патогенетическим механизмам развития сердечно-сосудистой патологии (сопредседатели Lionetti V., Italy, Pierce GN (Canada) и по изучению нетипичных связей и влияний при кардиологических заболеваниях (сопредседатели Turan B., Turkey, Zivkovic V., Serbia), по молекулярным механизмам развития неврологических нарушений (сопредседатели Churilov L., Russia, Selakovic D., Serbia). В рамках последнего симпозиума был сделан доклад Л.П. Чурилова и соавторов (Санкт-Петербург), посвященный изучению роли эндокринных факторов в развитии аутизма.

Традиционно большое внимание привлекает изучение молекулярных механизмов метаболических нарушений, чему было посвящено два симпозиума. На первом из них (сопредседатели Bosch S., France, Falcon-Perez J.M., Spain) обсуждалась роль экстрацеллюлярных везикул в развитии метаболических нарушений, на втором (сопредседатели Buttari H.S., Canada, Tuagi S.C., USA) – возможности использования стратегий здорового питания для профилактики развития болезней обмена веществ и повышения качества жизни. Специальные симпозиумы были посвящены изучению: оксидативного стресса (сопредседатели Aburel O.M., Romania, Moskovtsev A.A., Russia), роли митохондрий в патогенезе заболеваний и возможностям таргетной терапии (сопредседатели Muntean D., Romania, Teixeira J., Portugal), а также молекулярных механизмов патофизиологических каскадов в патогенезе (сопредседатели Todorovic Z., Serbia, Bozorgnia M., Slovak Republic). Не обошел своим вниманием конгресс и обсуждение вопросов канцерогенеза (сопредседатели Mogilenskikh A., Russia, Erdani Kreft M., Slovenia), механизмов инициации и прогрессии опухолей, поиска новых мишеней для их таргетной терапии (сопредсе-

дателя Kukreja R.C., USA, Lukina S.S., Russia), а также проблем регенеративной медицины (сопредседатели Bradic J., Serbia, Desyatova M.A., Russia).

В рамках конгресса был организован симпозиум, посвященный вопросам совершенствования преподавания патофизиологии в медицинских университетах. В процессе обсуждения Артем Григорян (A. Grigoryan, Армения) изложил интересный подход, который все чаще используется в мире для описания общих механизмов развития заболеваний. Речь идет об акцентировании так называемых «Hallmarks» (то есть, важнейших отличительных признаков и механизмов). После статьи Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer [2] данный термин все чаще используется для описания общих механизмов и отличительных особенностей формирования различных заболеваний. В частности, представлены версии описания в ключе Hallmarks процесса старения [3], легочной гипертензии [4] нейродегенеративных заболеваний [5], ряда других форм патологии, и даже предпринята попытка описать подобным образом общие признаки здоровья [6].

Обширные стендовые сессии под руководством большой международной команды модераторов (Pierce G.N., Canada, Dawn B., USA, Kolesnik S. & Svetlikov A.V. – Russia, Selakovic D., Bradic J., Stojanovic A., & Joksimovic-Jovic J. – Serbia) затронули весь диапазон патофизиологических исследований: от авиакосмической медицины до стоматологии и ЛОР-патологии. Ряд постеров содержали интересные данные. Так, Ю.С. Высочанская и Т.Д. Власов (ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова) показали, что бруксизм – не просто коррелирует со стрессом. Оказалось, что разное положение нижней челюсти при стрессе соотносится с разным типом стрессорного ответа, а коррекция позиции мандибулы позволяет увеличить стрессорезистентность испытуемых. Группа молодых патофизиологов из Боснии и Герцеговины (Milivojac T. et al.) представила данные о защитном действии желчных кислот при токсико-септическом шоке. Жюри признало лучшим стендовый доклад М. Норматова и соавт. (Россия, Таджикистан) об антигенном перекресте белков артериальной стенки и коронавируса человека в контексте постковидных осложнений атеросклероза.

В заключение, конгресс в Белграде решил ряд организационных вопросов работы МОП. Было отмечено, что после последнего конгресса 2018 г. в Братиславе общество переживает не лучший период. Был создан обновленный сайт общества (<https://ispweb.cc>), но его обновление проходит нерегулярно, многие во-

просы не освещаются. Возобновил работу на платформе MDPI журнал общества «Pathophysiology» (<https://www.mdpi.com/journal/pathophysiology>), главным редактором которого является Steven Alexander (США), однако пока журнал находится в третьем квартиле (Q3). Вскоре после конгресса стало известно, что журнал «Pathophysiology», входящий в базу Scopus, начал индексироваться и в базе WoS.

По традиции новым президентом общества стал представитель страны-хозяйки очередного форума МОП. Это основной организатор IX Конгресса МОП профессор Владимир Яковлевич (V. Jakovljevic, Serbia), на которого возлагаются большие надежды по поддержанию стабильной и эффективной работы МОП. При этом президиум МОП высоко оценил работу возглавляемого им оргкомитета по подготовке конгресса в Белграде.

На заседаниях Президиума МОП обсуждались пути совершенствования деятельности общества и прошли обновления состава президиума общества. От России в состав президиума вошли Сергей Болевич, Леонид Чурилов и Анатолий Кубышкин.

Основными приоритетами в работе нового президента и президиума были названы следующие:

- укрепление и консолидация Международного общества по патофизиологии;
- совершенствование работы вебсайта МОП;
- активизация работы национальных обществ по патофизиологии и стимулирование индивидуального членства;
- укрепление финансовой базы общества;
- привлечение к работе в обществе молодых ученых путем проведения под эгидой МОП региональных научных школ, тренингов и конференций для молодых исследователей.

Принято решение юбилейный X Конгресс МОП провести через 4 года в Стамбуле, (Турция) ориентировочно в 2026 или 2027 году, а в качестве хозяйки XI Конгресса рассматривается г. Москва на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Сегодня патофизиология как наука, и как учебная дисциплина продолжает развиваться под разными названиями во всем мире в качестве одной из ключевых базовых дисциплин в подготовке врача. Она перерастает рамки своего традиционного названия и, по сути, выполняет в системе медицинских наук интегрирующие функции системной патофизиологии, будучи фундаментом для проведения научных исследований в области интенсивно развивающейся трансляционной, прецизионной и восстановительной медицины.

**Литература/References**

1. *Final program and abstract book/ 9<sup>th</sup> International Congress of Pathophysiology and 5<sup>th</sup> Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation.* July, 4-6, 2023. Kragujevac: Grafopromet; 2023.
2. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1): 57-70.
3. Lopez-Otin C., et al. *The hallmarks of aging.* *Cell.* 2013; 153(6): 1194-217.
4. Cool C. D. et al. The hallmarks of severe pulmonary arterial hypertension: the cancer hypothesis – ten years later. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2020; 318(6): L1115-L1130.
5. Wilson D.M., et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell.* 2023; 186(4): 693-714.
6. Lopez-Otin C., Kroemer G. Hallmarks of health. *Cell.* 2021; 184(1): 33-63.

*Проф., д.м.н. А.В. Кубышкин, проф., д.м.н. С.Б. Болевич, проф., д.м.н. Л.П. Чурилов, проф., д.м.н. В. Яковлевич, проф., д.м.н. Е.П. Коваленко, проф., д.м.н. А.Е. Коровин*

УДК 616-092

## Объединенный пленум Российского научного общества патофизиологов и Санкт-Петербургского общества патофизиологов

10 ноября 2023 г. в Санкт-Петербурге на базе Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова состоялся объединенный пленум Российского научного общества патофизиологов и Санкт-Петербургского общества патофизиологов, посвященный преподаванию патофизиологии в Российских медицинских университетах и институтах. Пленум был организован Российским научным обществом патофизиологов, Санкт-Петербургским обществом патофизиологов, ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Институтом иммунологии и физиологии УрО РАН и Первым Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом им. академика И.П. Павлова. В работе пленума участвовали 97 заведующих и преподавателей кафедр патофизиологии из разных регионов России (Москвы, Санкт-Петербурга, Екатеринбурга, Петрозаводска, Ижевска, Томска, Уфы, Красноярска, Сургута, Симферополя, Пскова, Тулы, Архангельска, Новгорода, Саратова, Донецка и др.). Было заслушано 28 пленарных докладов, подготовленных 30 авторами, в которых были рассмотрены вопросы преподавания патофизиологии в медицинских ВУЗах России.

На открытии Пленума с приветственным словом выступили ректор ПСПбМУ им. академика И.П. Павлова академик РАН С.Ф. Багненко, заместитель академика секретаря Отделения медицинских наук РАН – руководитель секции медико-биологических наук, заместитель председателя Российского научного общества патофизиологов академик РАН А.М. Дыгай, директор ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», зам. председателя Российского научного общества патофизиологов член-корреспондент РАН С.Г. Морозов.

Во вступительном слове председатель Российского научного общества патофизиологов академик РАН А.А. Кубатиев поздравил участников Пленума с его открытием и отметил ряд недостатков программы и учебников по патофизиологии, существующих на сегодняшний день.

В настоящее время ответственность за фундаментальную подготовку врачей перенесена исключительно на кафедральные коллективы медицинских вузов, которые самостоятельно разрабатывают рабочие учебные программы, т.к. не существует даже примерной единой программы по патофизиологии для РФ. В докладе за-

ведующего кафедрой патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ПСПбМУ им. И.П. Павлова профессора Т.Д. Власова были рассмотрены вопросы соответствия программы по патофизиологии настоящему времени. Традиционная программа по патофизиологии в значительной степени сохраняет структуру и темы, которые содержались в первых учебниках и руководствах по патофизиологии. В связи с этим преподавание патофизиологии отстает от современной теоретической науки, получившей бурное развитие в 20 веке и особенно в начале 21 века. Однако невозможно вводить дополнительные материалы при столь интенсивном развитии науки в настоящее время. Главным отличием патофизиологии от других учебных дисциплин в медицинских вузах является интегральное и обобщенное восприятие, а также особая подача материала для ее изучения. На современном отрезке времени, если рассматривать патофизиологию как дисциплину, формирующую клиническое мышление и мировоззрение будущего врача, именно общей патофизиологии следует уделить основное внимание в ее преподавании, перенеся из «частной патофизиологии» ряд тем, имеющих характер типовых патологических процессов.

В настоящее время остро стоит проблема кадрового обеспечения для преподавания патофизиологии, которой был посвящен доклад заведующего кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова профессора Ж.М. Салмаси. Очень сложно в настоящее время найти квалифицированные кадры для преподавания патофизиологии и особенно клинической патофизиологии. В этих условиях как никогда неопределима роль коллективов кафедр, заведующие и преподаватели которых имеют глубокую патофизиологическую подготовку, полученную на основе традиций той или иной ведущей школы. Следует рассмотреть возможность подготовки кадров преподавателей не только через аспирантуру по патофизиологии, но и через студенческие научные кружки при кафедрах патофизиологии.

Сложная ситуация складывается на курсах патофизиологии медицинских факультетов классических университетов, где нет самостоятельных кафедр патофизиологии. В этих условиях возникает большая опасность потери патофизиологии как самостоятельной дисциплины,

а также неизбежна потеря опыта и квалификации профессорско-преподавательского состава. В своем докладе заведующий кафедрой патологии медицинского факультета СПбГУ доцент Л.П. Чурилов, представил новый взгляд на предмет «патофизиология» на факультетах университетов с позиций системной патобиологии, для подготовки специалистов со смешанными компетенциями.

Многие доклады на Пленуме были посвящены преподаванию клинической патофизиологии (зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии медицинской академии им. С.И. Георгиевского, ФГАОУ ВО КФУ им. В.И. Вернадского, профессор А.В. Кубышкин и др.). В настоящее время требуется унификация преподавания клинической патофизиологии, комплексирование и координация с клиническими кафедрами и базами. Целесообразным представляется преподавание дисциплины на 5-6 курсах лечебного и педиатрического факультетов, причем лучше на клинической базе.

В докладе профессора кафедры патофизиологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова Морозовой О.Л. были подробно рассмотрены современные информационные технологии, используемые на кафедре для углубленного изучения патофизиологии. О роли учебного эксперимента в преподавании патофизиологии и возможности замены его программ-стимуляторами, как методом визуализации экспериментов в своих докладах говорили член-корреспондент РАН М.М. Галагудза (Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова) и ассистент кафедры патофизиологии Донецкого государственного медицинского университета им. М. Горького А.Д. Есаулов.

О приоритетах, проблемах и новых подходах в преподавании в СИБГМУ (г. Томск) поделилась заведующая кафедрой патофизиологии член-корреспондент РАН О.И. Уразова. Кадровый вопрос на этой кафедре решается за счет привлечения молодых сотрудников из числа воспитанников кафедры, для которых создаются оптимальные условия для карьерного роста. На кафедре проводится активная профориентационная работа (лекции, мастер-классы, тренинги). Разрабатываются электронные образовательные модули для цифрового предвуниверсария «МедКласс» с целью знакомства школьников – будущих абитуриентов – с предметом и методами патофизиологии. В настоящее время кафедра ориентируется на создание новых образовательных продуктов, внедрение современных организационных форм обучения, для совершенствования творческих и профессиональных навыков учащихся.

Заведующий кафедрой патологической физиологии ВМА им. С.М. Кирова профессор В.М. Цыган проанализировал учебную литературу и показал необходимость для непрерывного медицинского образования включения вопросов клинической патофизиологии в учебные программы и учебники для последипломного образования специалистов.

Большой интерес у участников Пленума вызвал доклад зав. кафедрой патологической физиологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического университета, предложивший создание и поддержание Web-платформы для оперативного обсуждения патофизиологами РФ основополагающих и текущих проблем в учебной, научной и практической сферах. На этой платформе можно задавать вопросы по горящим проблемам науки патофизиология, обмениваться мнениями, делиться своими успехами, обмениваться видеоматериалами, популяризировать учебную литературу и решать многие другие вопросы.

Подводя итоги Пленума, участники приняли резолюцию, в которой был принят ряд решений. Во-первых, о необходимости преемственности преподавания дисциплины «Патологическая физиология» на лечебном, медико-профилактическом и педиатрическом факультетах в 4 и 5 семестрах, после прохождения дисциплин «Нормальная физиология» и «Биохимия», а преподавание клинической патофизиологии должно проводиться на 5-6 курсах, для более глубокой интеграции с клиническими дисциплинами. Во-вторых, определить содержание программы преподавания клинической патофизиологии на додипломном и последипломном уровне. В-третьих, необходимо совершенствовать систему непрерывной (трехступенчатой) фундаментальной подготовки специалистов и уделять постоянное внимание работе с научной молодежью через кружки СНО и молодежные научные форумы. В-четвертых, для обмена мнениями по учебно-методическим вопросам между кафедрами различных вузов рекомендована организация интернет площадки (сайт Санкт-Петербургского общества патофизиологов <http://www.pathophysiology.ru>, учебно-методический раздел журнала «Клиническая патофизиология» <http://clinical-pathophysiology.ru>).

Пленум прошел в теплой, дружественной обстановке. Участники в перерывах смогли обменяться мнениями по вопросам преподавания патофизиологии, поделиться своими планами и педагогическими разработками, а также укрепить необходимые межкафедральные связи между различными медицинскими вузами РФ.

*Доктор мед. наук Т.В. Давыдова*