
ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Издается с 1957 г.



В.В. Пашутин
(1845 – 1901)

1

Vol. 68

2024

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

Выпускающий редактор Н.Ю. Клишина
Верстка Е.М. Архипова

Сдано в набор 14.03.2024
Подписано к печати 21.03.2024
Опубликовано 28.03.2024

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

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2024. Том 68 № 1. 1–144.

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, 2024.



«НИИ Общей патологии и патофизиологии»
Общество патофизиологов

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Основан в 1957 г.

Том 68 № 1 · 2024

Январь–Март

Главный редактор:

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

Заместители главного редактора:

С.Г. Морозов, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., НИИОПП, Москва*

Л.И. Колесникова, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ НЦПЗСРЧ, Иркутск*

И.С. Гуштин, *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*

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*

Д.А. Еникеев, *д.м.н., проф., БГМУ, Уфа*

В.П. Куликов, *д.м.н., проф., АМИПДО, Барнаул*

В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ЯГМУ, Ярославль*

В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*

С.Н. Орлов, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*

М.В. Осиков, *д.м.н., проф., ЮУГМУ, Челябинск*

Н.Н. Петрищев, *д.м.н., проф., ПСПбГМУ, Санкт-Петербург*

Л.А. Северьянова, *д.м.н., проф., КГМУ, Курск*

В. Шварц, *д.м.н., проф., Саарский Университет, Хомбург/Саар, Германия*

**Certificate of registration MASS
MEDIA: PI NO. F577-84858 dated March
21, 2023, issued by Federal
Service for Supervision in the sphere
of communications, information 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
The issuing editor: N.Yu. Klishina
Layout: E.M. Arkhipova

Sent into set on 14.03.2024
Signed for publication on 21.03.2024
Published on 28.03.2024

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

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter
2024. Volume 68. No. 1–144.

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, 2024.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Russian Society of Pathophysiology

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

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

Pathological physiology and experimental therapy

Quarterly reviewed science and practical journal

Published since 1957

Vol. 68 № 1 · 2024

January–March

Editor-in-chief:

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

Deputy chief editors:

S.G. Morozov, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

L.I. Kolesnikova, *Acad. RAS, DSc, Prof., Scientific Center for Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russia*

I.S. Gushchin, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Institute 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. Eftremov, *DSc, Prof., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 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*

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

- Зайченко Д.М., Пасько А.Ю., Микрюкова А.А., Астафьева Я.Р., Малахо С.Г., Кубатиев А.А., Московцев А.А.** Фрагменты транспортной РНК при клеточном старении, индуцированном стрессом эндоплазматического ретикулума 4
- Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А., Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Хамнагдаева Н.В.** Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости 15
- Беда Е.Е., Габитов М.В., Гребенчиков О.А.** Влияние ксенона в различных концентрациях на объём поражения головного мозга и выраженность неврологических нарушений у крыс при моделировании открытой черепно-мозговой травмы . 26
- Лебедева А.И., Гареев Е.М., Дусалимова А.М., Кадиров Р.З., Мусина Л.А., Галаутдинов М.Ф., Тергулов И.И.** Морфофункциональные изменения нервной ткани коры головного мозга в условиях вынужденной анаэробной физической нагрузки и после акупунктурного введения аллогенного биоматериала (экспериментальное исследование) 37
- Осиков М.В., Коробкин Е.А., Димов Г.П.** Продукты пероксидации липидов в костной ткани как маркеры остеопении у больных с хроническим лимфолейкозом 48
- Кузьмина Е.Г., Черкашенко В.Н., Павлов В.В., Мушкаркина Т.Ю., Антонов К.Н., Устинова Е.Е., Богданенко Е.В., Сабурова И.Н.** Анализ структурных особенностей многомерных данных периферической крови при хроническом лимфоцитарном лейкозе и неходжкинской В-лимфоме в сравнении с нормой 55
- Сабурова И.Н., Кузьмина Е.Г., Черкашенко В.Н., Павлов В.В., Зацаренко С.В., Антонов К.Н., Богданенко Е.В., Устинова Е.Е., Морозов С.Г.** Сравнительный анализ структурных особенностей многомерных данных периферической крови при хроническом лимфоцитарном лейкозе и неходжкинской В-лимфоме 69
- Гераскин И.В., Дерюгина А.В., Гераскина Н.В., Гераскин В.А.** Влияние возрастных изменений состава физиологических гемоглобинов и кислородного баланса крови на формирование реактивности организма в неонатальном периоде 81
- Синюкова Т.А., Мордовина И.И., Коваленко Л.В., Белоцерковцева Л.Д.** Влияние фетоплацентарной недостаточности у беременных женщин при внутриутробном инфицировании на состояние здоровья новорожденных и детей раннего возраста 89
- Степанова О.И., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Карганов М.Ю., Никольская А.О., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Онищенко Н.А., Басок Ю.Б.** Динамика состояния клеток крови и костного мозга у мышей при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа 98
- Панова Э.В., Зыкина Н.С., Илюха В.В.** Биологическое действие экстракта листьев стевии на обменные процессы мышей C57BL/6 109

МЕТОДИКА

- Маковеева К.А., Егорова Б.В., Коков К.В., Артюхов А.А., Кузнецова Т.М., Курочкин А.В., Ершов А.О., Касацкий П.С., Коневага А.Л., Рыбакова А.В., Трашков А.П., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С., Чувилин Д.Ю., Гончаров Н.Г.** Создание радиофармацевтической транспортной конструкции для диагностики и терапии ревматоидных артритов 114

ОБЗОРЫ

- Тишевская Н.В., Геворкян Н.М.** Рибонуклеиновые кислоты лимфоидных клеток как регуляторы иммунного ответа и потенциальные индукторы действия противовирусных вакцин 126
- Евдокимова Н.В., Черненко Т.В.** Современный взгляд на микробиом мочевыводящих путей 138

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Zaichenko D.M., Pasko A.Y., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Kubatiev A.A., Moskovtsev A.A.** Fragments of transfer RNA during cellular senescence induced by chronic endoplasmic reticulum stress 4
- Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Rogozhina L.S., Stupin V.A., Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Khamnagdaeva N.V.** Neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases of the abdominal cavity 15
- Beda E.E., Gabitov M.V., Grebenchikov O.A.** The effect of xenon in various concentrations on the volume of brain damage and the severity of neurological disorders in a rat model of open traumatic brain injury 26
- Lebedeva A.I., Gareev E.M., Dusaliyeva A.M., Kadyrov R.Z., Muzina L.A., Galautdinov M.F., Teregulov I.I.** Morphological and functional changes in the nervous tissue of the cerebral cortex in forced anaerobic exercise and after acupuncture injection of allogeneic biomaterial (experimental study) 37
- Osikov M.V., Korobkin E.A., Dimov G.P.** Products of lipid peroxidation in bone tissue as markers of osteopenia in patients with chronic lymphocytic leukemia 48
- Kuzmina E.G., Cherkashenko V.N., Pavlov V.V., Mushkarina T.U., Antonov K.N., Ustinova E.E., Bogdanenko E.V., Saburina I.N.** Analysis of structural features of multidimensional data for peripheral blood in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin B-lymphoma compared with the norm 55
- Saburina I.N., Kuzmina E.G., Cherkashenko V.N., Pavlov V.V., Zaczarenko S.V., Antonov K.N., Bogdanenko E.V., Ustinova E.E., Morozov S.G.** Comparative analysis of structural features of multidimensional data of peripheral blood in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's B-lymphoma 69
- Geraskin I.V., Deryugina A.V., Geraskina N.V., Geraskin V.A.** The effect of age-related changes in the composition of physiological hemoglobins and blood oxygen balance on the formation of reactivity of the body in the neonatal period 81
- Sinyukova T.A., Mordovina I.I., Kovalenko L.V., Belotserkovtseva L.D.** The effect of fetoplacental insufficiency in pregnant women with intrauterine infection on the health of newborns and young children 89
- Stepanova O.I., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Karganov M.Yu., Nikolskaya A.O., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Onishchenko N.A., Basok Yu.B.** The dynamics of changes in blood cells and bone marrow of mice with progressive type 2 diabetes mellitus 98
- Panova E.V., Zykina N.S., Ilyukha V.V.** The biological effect of stevia leaf extract on metabolic processes in C57BL/6 mice 109

METHODS

- Makoveeva K.A., Egorova B.V., Kokov K.V., Artyukhov A.A., Kuznetsova T.M., Kurochkin A.V., Ershov A.O., Kasatsky P.S., Konevega A.L., Rybakova A.V., Trashkov A.P., Kolotaev A.V., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Chuvilin D.Yu., Goncharov N.G.** Synthesis of a radiopharmaceutical for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis 114

REVIEWS

- Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M.** Ribonucleic acids of lymphoid cells as regulators of the immune response and potential inducers of the action of antiviral vaccines 126
- Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V.** A modern view of the urinary tract microbiome 138

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092

Зайченко Д.М.^{1,3,4}, Пасько А.Ю.¹, Микрюкова А.А.¹, Астафьева Я.Р.¹, Малахо С.Г.⁵, Кубатиев А.А.¹, Московцев А.А.^{1,2,3}

Фрагменты транспортной РНК при клеточном старении, индуцированном стрессом эндоплазматического ретикулума

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

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

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

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

⁴ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 10, корп. 2;

⁵Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы, 125284, Москва, Россия, 2-й Боткинский проезд, д. 5

Транспортная РНК играет ключевую роль в жизнедеятельности клетки, обеспечивая процесс декодирования генетической информации в белковом синтезе. Как показывают последние исследования, молекула тРНК может выполнять другие функции благодаря процессингу. Расщепление пре-тРНК и зрелой тРНК приводит к образованию различных некодирующих РНК, среди которых так называемые половинки тРНК (tRNA halves), также известные как индуцированные стрессом РНК (stress-induced tRNA), tRNA-derived или tiRNA. Описаны также меньшие фрагменты тРНК (tRFs). Характерным примером «двойного назначения» тРНК является разрезание активируемой при клеточном стрессе нуклеазой ангиогенин тРНК в антикодонной петле с генерацией половинок, из которых 5'-фрагменты опосредуют временное выключение трансляции при стрессе. Ранее нами было впервые показано увеличение содержания tiRNA при остром стрессе эндоплазматического ретикулума и способность хронического стресса ЭПР приводить к формированию фенотипа клеточного старения. В работе с помощью высокопроизводительного секвенирования впервые анализируется профиль фрагментов тРНК при ЭПР-стресс-индуцируемом старении и сопоставляется с профилем при репликативном старении. Обнаружен ряд общих фрагментов тРНК для этих двух состояний. Они потенциально могут использоваться в качестве маркеров процессов клеточного старения.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума; стресс-индуцируемое старение; тРНК; процессинг тРНК

Для цитирования: Зайченко Д.М., Пасько А.Ю., Микрюкова А.А., Астафьева Я.Р., Малахо С.Г., Кубатиев А.А., Московцев А.А. Фрагменты транспортной РНК при клеточном старении, индуцированном стрессом эндоплазматического ретикулума.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2024; 68(1): 4–14.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.4-14

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Зайченко Д.М., Московцев А.А.; сбор данных – Зайченко Д.М., Пасько А.Ю., Микрюкова А.А., Астафьева Я.Р., Малахо С.Г., Московцев А.А.; анализ и интерпретация данных – Московцев А.А.; подготовка иллюстративного материала – Московцев А.А.; написание статьи – Московцев А.А.; редактирование статьи – Зайченко Д.М., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.12.2023

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Zaichenko D.M.^{1,3,4}, Pasko A.Y.¹, Mikryukova A.A.¹, Astafeva I.R.¹, Malakho S.G.⁵, Kubatiev A.A.¹, Moskovtsev A.A.^{1,2,3}

Fragments of transfer RNA during cellular senescence induced by chronic endoplasmic reticulum stress

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education,

2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation;

³Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,

24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russian Federation;

⁴Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),

10 Miklouho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russian Federation;

⁵Botkin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department,

bld. 5, 2-Botkinsky proezd, Moscow, 125284, Russian Federation

Transfer RNA plays a key role in the cell, providing the process of decoding genetic information. Recent research shows that the tRNA molecule can perform other functions due to processing. Cleavage of pre-tRNA and mature tRNA leads to the formation of various non-coding RNAs, among which are so-called tRNA halves, also known as stress-induced tRNA, tRNA-derived or tiRNA. Smaller tRNA fragments (tRFs) have also been described. A typical example of «dual purpose» tRNA is the cutting of tRNA in the anticodon loop by cellular stress-activated nuclease angiogenin, generating halves, of which the 5' fragments mediate temporary translation shutdown under stress. Previously, we demonstrated an increase in tiRNAs during acute endoplasmic reticulum stress and the ability of chronic ER stress to lead to the formation of a cellular senescence phenotype. In this work, using high-throughput sequencing, the profile of tRNA fragments during ER stress-induced cellular senescence is analyzed for the first time and compared with the profile during replicative senescence. A number of common tRNA fragments have been found for these two conditions. They can potentially be used as markers of cellular senescence.

Keywords: endoplasmic reticulum stress; stress-induced senescence; tRNA; tRNA processing**For citation:** Zaichenko D.M., Pasko A.Y., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Kubatiev A.A., Moskovtsev A.A. Fragments of transfer RNA during cellular senescence induced by chronic endoplasmic reticulum stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 4–14. (in Russian) DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.4-14**Author's contribution:** concept and design of the study – Zaichenko D.M., Moskovtsev A.A.; collection of material – Zaichenko D.M., Pasko A.Y., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Moskovtsev A.A.; technical preparation of the material – Moskovtsev A.A.; preparation of illustrative material for publication – Moskovtsev A.A.; writing the text – Moskovtsev A.A.; editing the text – Zaichenko D.M., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.**For corresponding:** *Aleksey A. Moskovtsev*, PhD, Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: bioinf@mail.ru**Information about the authors:**Zaichenko D.M., <https://orcid.org/0000-0003-0241-0065>Mikryukova A.A., <https://orcid.org/0009-0005-2274-8006>Astafeva I.R., <https://orcid.org/0009-0006-3473-5453>Malakho S.G., <https://orcid.org/0009-0001-6019-8704>Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>**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.

Received 13.12.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Эволюционно консервативная функция тРНК — участие в синтезе белков путем декодирования триплетов нуклеотидов мРНК в аминокислотную последовательность [1–3]. тРНК обеспечивает ключевой этап реализации генетической информации — конвертацию «мира РНК» клетки в ее протеом в соответствии с правилами генети-

ческого кода — фундаментальной основы всего живого. В связи с таким центральным и древнейшим положением в клетке, неудивительно, что тРНК также оказывается вовлечена в целый ряд других важнейших процессов — метаболизм аминокислот, клеточную сигнализацию, ответ на клеточный стресс, в адаптацию, апоптоз [1, 3, 4].

тРНК – сравнительно небольшие молекулы, их типичный размер составляет порядка 76 (73–95) нуклеотидов, они характеризуются базовыми консервативными структурами, включающими 3 элемента типа стебель-петля: D-петля (содержащая дигидроуридин), антикодоновая петля и T-петля, или ТΨС-петля (содержащая тимидин, псевдоуридин и цитидин), а также стебель акцептора аминокислот (рис. 1, А), эти петли сворачиваются совместно так, что формируется L-образная трехмерная конформация (рис. 1, Г), одно плечо которой образовано акцепторным стеблем и T-петлей, второе – D- и антикодоновой петлями [5]. Интересно, что расчетные вторичные структуры при минимальной свободной энергии (рис. 1, Б) и центроидной вторичной структуры (рис. 1, В) показывают для молекулы тРНК Asp с антикодоном GUC (tdbR00000662) разрушение стебля в районе D-петли в условиях *in vitro*.

Молекулы тРНК характеризуются обширными посттранскрипционными модификациями, которые способствуют высокой стабильности тРНК в клетке, в том числе устойчивости к нуклеазам, влияют на структуру, фолдинг молекулы тРНК, точность опосредуемой ей трансляции и ее тонкую настройку [2, 3, 5, 8]. Геном человека содержит более 500 генов, кодирующих более 40 различных тРНК, 22 тРНК кодируется митохондриальным геномом [9–12].

тРНК, кодируемые в ядре, образуют 21 семейство изоакцепторных тРНК, каждое из которых включает тРНК с разными антикодонами, но связывающими одну и ту же аминокислоту, включая селеноцисте-

ин, в соответствии с вырожденностью генетического кода [5]. Изодекодерные тРНК, напротив, несут один и тот же антикодон, но имеют отличия в остальной нуклеотидной последовательности – интересно, что наблюдается тенденция к увеличению числа генов-изодекодеров вдоль филогенетического древа [5, 13], что может быть связано с разнообразным контекстом экспрессии – клеточным окружением, типом ткани [5], и это согласуется с увеличением числа типов клеток у высших многоклеточных. Однако, данных по тРНК-транскриптомам единичных клеток, которые помогли бы построить обоснованное представление о специфичности изодекодеров к клеточному контексту и типу, недостаточно.

К настоящему времени идентифицированы некодирующие РНК, происходящие из нуклеотидных последовательностей тРНК и являющиеся, таким образом, их частями. С помощью высокопроизводительного секвенирования в клетках млекопитающих обнаружены различные классы фрагментов тРНК, количество которых варьируется в зависимости от типа клеток и тканей и в большинстве случаев не коррелирует с количеством «родительских» тРНК. Некоторые фрагменты образуются только при специфических условиях, таких, как определенная стадия развития, пролиферативный статус, стресс или вирусная инфекция [14–17]. Несмотря на то, что описанные классы фрагментов тРНК неоднородны по размеру (10–45 нуклеотидов), они, по-видимому, не являются продуктами случайного расщепления или деградации тРНК, поскольку их концы воспроизводимо картируются на

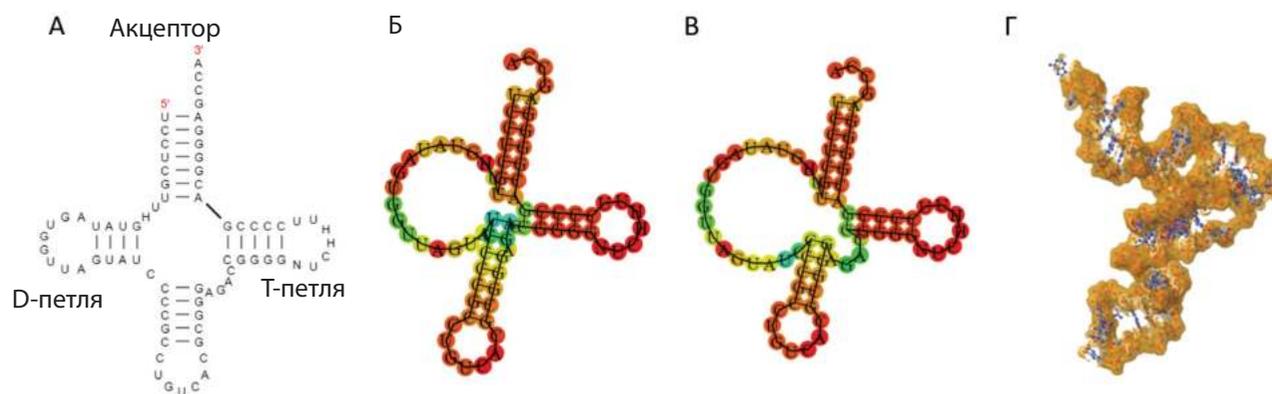


Рис. 1. Структуры молекулы тРНК Asp (А) с антикодоном GUC (tdbR00000662) при минимальной свободной энергии (Б), центроидной вторичной структуры (В) и трехмерной конформации (Г), выборка из базы данных [6], расчет вторичных структур с использованием The Vienna RNA Websuite [7].

Fig. 1. Structures of the Asp tRNA molecule (А) with the GUC anticodon (tdbR00000662) with minimum free energy (Б), centroid secondary structure (В) and three-dimensional conformation (Г), selection from the database [6], the calculation of secondary structures was performed using The Vienna RNA Websuite [7].

геном и определяются специфическими паттернами расщепления РНК.

Процессинг пре-тРНК и зрелой тРНК приводит к образованию различных нкРНК. Фрагменты тРНК, полученные из зрелой тРНК, делятся на два типа. Первый тип – половинки тРНК (tRNA halves), также известные как индуцированные стрессом РНК (stress-induced tRNA), tRNA-derived или tiRNA (рис. 2). Второй тип – мелкие фрагменты тРНК (tRFs) – обрезанные D-шпильки, а также Т-шпильки с акцепторным стержнем, при этом Dicer-зависимое расщепление тРНК в D-петле приводит к образованию 5'-концевых фрагментов 5'-tRFs, а расщепление в Т-петле с помощью Dicer или ангиогенина ANG приводит к образованию tRFs, содержащих мотив ССА на 3'-концах (3'ССА tRFs); 5'-tRFs и 3'ССА tRFs также могут быть образованы из 5'- и 3'-половинок соответственно [1].

Половинки тРНК образуются путем специфического расщепления в антикодоновой петле тРНК. Ранее считалось, что доминирующую роль в этом процессе играет ангиогенин ANG, член суперсемейства РНКаз А – белок, транслоцирующийся в ядро и стимулирующий транскрипцию рибосомальной РНК в благоприятных условиях роста, но накапливающийся в цитоплазме в ответ на клеточный стресс [19], при котором ANG расщепляет цитоплазматическую тРНК на 5'- и 3'-tiRNAs [20]. Некоторые из этих фрагментов (5'-концевые) вызывают независимые от фосфо-

рированного фактора инициации трансляции eIF2 α блок трансляции [21] и сборку стрессорных гранул [22] – адаптивные реакции, необходимые для выживания высших эукариот [23]. Интуитивно кажется, что расщепление тРНК само по себе должно вызывать остановку трансляции, однако оказалось, что расщепляется лишь небольшая часть пула тРНК (менее 5%) [20], и фрагменты тРНК выступают в роли конкурентного ингибитора сборки кеп-связывающего инициаторного комплекса eIF4F, и именно они, причем преимущественно 5'-tiRNAs, ответственны за фосфо-eIF2 α -независимый блок трансляции [21].

Ранее нами было показано, что при остром стрессе эндоплазматического ретикулума, индуцируемого 2.5мМ дитиотреитолом в Т-лимфобластоидной линии Jurkat, наиболее сильно увеличивали свою экспрессию половинки тРНК из пяти тРНК-изотипов, включая глицин Gly-GCC и Gly-CCC, глутамин (Glu-CTC), аспарагин (Asp-GTC) и валин (Val-CAC), т.е. большинство из них являлось 5'-половинками, за исключением 3'-tiRNA^{Asp-GTC} [18].

Сравнительно недавно было показано, что оверэкспрессия ANG приводила к селективному расщеплению определенного набора тРНК, включая тРНК^{Glu}, тРНК^{Gly}, тРНК^{Lys}, тРНК^{Val}, тРНК^{His}, тРНК^{Asp}, and тРНК^{Sec} с генерацией половинок и 5'-tRFs, однако, нокаут ANG, по мнению авторов, показал, что большинство стресс-индуцируемых половинок тРНК, исключая 5'-половинки тРНК

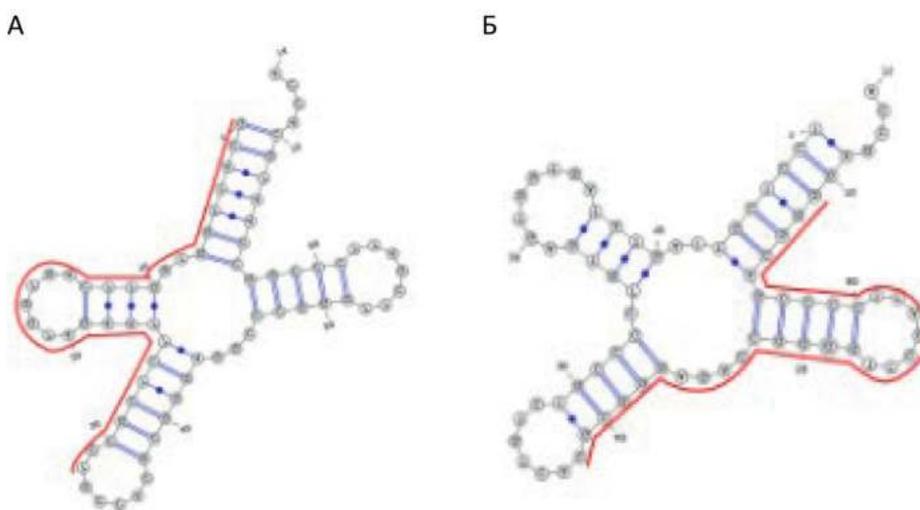


Рис. 2. Процессинг зрелых форм тРНК с образованием фрагментов-половинок тРНК. Красной обгибающей выделены обнаруживаемые фрагменты: А-5'-половинки, Б-3'-половинки. Взято из [18].

Fig. 2. Processing of mature forms of tRNA with the formation of tRNA-half fragments. The red line highlights the detected fragments: A-5'-halves, B-3'-halves. Taken from [18].

His^{GTG} и 3'-половинки тРНК^{Asp^{GTC}}, независимы от ANG [24]. Это позволило авторам предположить активность других рибонуклеаз в продукции половинок тРНК.

Несмотря на большой интерес к новым типам регуляторных некодирующих РНК, происходящих из тРНК, они мало изучены при клеточном старении. В данной работе мы исследовали накопление фрагментов тРНК при хроническом стрессе эндоплазматического ретикулума, который, как мы показали ранее [25], способен индуцировать фенотип клеточного старения. Мы сопоставили профиль этих фрагментов с фрагментами тРНК, накапливающимися при репликативном старении, и обнаружили ряд совпадений и отличий, что может указывать на наличие специфических и общих маркеров из тРНК-фрагмента для этих двух состояний.

Методика

Клеточные культуры. В работе использовали первичную культуру фибробластоподобных клеток FRSN из крайней плоти ребенка 3 лет, полученную из Российской коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Эти клетки имеют фибробластоподобную морфологию, экспрессируют поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и не экспрессируют CD34 и HLA-DR. Клетки имеют нормальный кариотип человека (46, XY), количество полиплоидов составляет 13%, модальное число хромосом 46 ($98.5 \pm 1.2\%$).

Клетки культивировали в ростовой среде DMEM с глюкозой (4.5 г/л) с добавлением 10% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамин при 37°C и 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего.

Индукция хронического стресса ЭПР. Хронический стресс ЭПР в клетках FRSN индуцировали дитиотрептолом (ДТТ), восстанавливающим дисульфидные связи в белках. ДТТ использовали в субтоксической концентрации (0.75 мМ), которая была подобрана в предварительных экспериментах. Субтоксической считали концентрацию ДТТ, достаточную для остановки клеточной пролиферации, но не вызывающую гибель существенной части клеток. В течение 4 сут индуктор добавлялся 1 раз в свежую ростовую среду после удаления ростовой среды предыдущего дня. Затем следовала постстрессовая фаза, в которой проводилась полная замена среды ежедневно без добавления индуктора стресса, минимальная длительность этой фазы составляла 1 сут, максимальная – 4 сут. В постстрессовой фазе среду заменяли 1 раз в сутки на полную среду.

Выделение суммарной РНК. Суммарную РНК выделяли с использованием набора реагентов RNeasy® Mini Kit («Qiagen GmbH», Германия). Лизис клеток проводили непосредственно в культуральной посуде (чашках Петри, 6-луночных планшетах) после удаления ростовой среды. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.»).

Высокопроизводительный анализ экспрессии малых РНК и анализ биологических процессов по терминам геной онтологии. Библиотеки малых РНК получены с использованием Illumina TruSeq small RNA library preparation kit («Illumina», США). Процедура подготовки состояла из нескольких последовательных этапов: лигирования фракции малых РНК (0.3–0.5 мкг) на 3'- и 5'-концах с синтетическими РНК-адапторами, обратной транскрипции и амплификации (обогащения) с использованием праймеров для секвенирования Illumina с баркодами для мультиплексирования образцов. Перед проведением ПЦР все библиотеки подвергали процедуре нормирования с использованием дополнительной количественной ПЦР в формате SYBR Green с праймерами, идентичными Illumina TruSeq PCR primer, но без концевых модификаций. Амплифицированные библиотеки очищали при помощи электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Для валидации библиотек и количественной их оценки проводили дополнительную количественную ПЦР в соответствии с протоколом Illumina qPCR Library quantification protocol («Illumina»). Нормированные библиотеки малых РНК секвенировали (36 циклов) с использованием генетического анализатора MiSeq Illumina.

Для обработки файлов, полученных в результате секвенирования и прошедших препроцессинг с «обрезанием» индексных последовательностей, использовали локально установленное программное обеспечение MiSeq Reporter v.2.6.3. Прочитанные последовательности малых РНК с обрезанными 3'-адапторами (5'-TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG) подвергали фильтрации по качеству ридов (≥ 30 Phred Score): фильтрацию прошли 96.9%. Затем прочитанные последовательности картировали с использованием приложения Bowtie с установленным требованием полного совпадения с версией hg19 сборки генома человека.

Для анализа генного листа, сформированного по результатам выравнивания фрагмента тРНК tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4, использовали веб-базу данных <https://www.pantherdb.org> и термины геной онтологии.

Таблица 1/Table 1

Перечень 88 наиболее представленных фрагментов тРНК, обнаруженных в клетках FRSN при пролонгированном 0.75 мМ ДТТ-индуцированном стрессе

List of the 88 most abundant tRNA fragments found in FRSN cells under prolonged stress induced by 0.75 mM DTT

Наименование фрагмента	Последовательность фрагмента, 5'-3'	Представленность фрагмента, суммарное число прочтений*
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1162921
tDR-1:33-Gly-CCC-1-M4	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCT	502922
tDR-1:33-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCT	175647
tDR-1:33-Val-CAC-2	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	160754
tDR-1:32-Val-AAC-1-M6	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGC	115919
tDR-1:32-Gly-CCC-1-M4	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCC	99915
tDR-1:33-Val-AAC-2	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTGTAGAAATCTCGCCT	62887
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U33A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCA	52228
tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGC	35233
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G26U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCT	27997
tDR-1:33-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCT	23061
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U33G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCCG	18239
tDR-1:32-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCC	14214
tDR-1:33-Val-AAC-1-M8-G26A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACATTCGCT	13268
tDR-1:34-Val-AAC-1-M6-A34G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTG	10624
tDR-1:34-Lys-CTT-2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTC	10162
tDR-1:33-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT	9663
tDR-1:34-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCTG	9161
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G26C	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACCTTCGCT	8504
tDR-1:31-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCG	8297
tDR-1:34-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTC	7818
tDR-1:30-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGC	7420
tDR-1:32-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGC	7383
tDR-1:33-Lys-CTT-2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACT	7089
tDR-1:34-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCTG	6905
tDR-1:33-Gly-GCC-1-U32A	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCA	6886
tDR-1:34-Val-CAC-1-M3	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTC	6635
tDR-2:30-His-GTG-1	CCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGC	6495
tDR-1:34-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTC	5568
tDR-1:33-Val-CAC-2-G26U	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCT	5323
tDR-1:35-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCT	5212
tDR-1:33-Val-CAC-3	GTTTCCGTAGTGTAGCGTTATCACATTCGCT	5104
tDR-1:32-Val-CAC-2	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCC	4991
tDR-1:32-Lys-TTT-3-M2	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGAC	4912
tDR-16:42-Glu-CTC-1-M2	TGGTTAGGATTCGGCGCTCTCACC GCC	4830
tDR-1:33-Lys-TTT-3-M2	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT	4665
tDR-3:33-Val-AAC-1-M6	TTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	4486
tDR-1:31-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCG	4480
tDR-1:31-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGC	4390
tDR-1:33-Gly-GCC-1-U16C	GCATGGGTGGTTCAGCGGTGTAGAAATCTCGCCT	3799
tDR-3:33-Gly-GCC-1	ATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCT	3710
tDR-1:35-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTCT	3633
tDR-3:33-Gly-CCC-1-M4	ATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCT	3478
tDR-1:36-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTC	3393
tDR-1:35-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATCTCGCCTGC	3321

Продолжение таблицы см. на стр. 10.

Наименование фрагмента	Последовательность фрагмента, 5'-3'	Представленность фрагмента, суммарное число прочтений*
tDR-1:33-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTT	3084
tDR-14:50-Glu-CTC-1-M2	AGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTCACCGCCGCGGCC	2972
tDR-1:33-Val-AAC-2-U33A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACGTTGCGCA	2864
tDR-1:33-Glu-TTC-3-M4	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCT	2728
tDR-1:33-Glu-TTC-2	TCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTT	2721
tDR-1:32-Val-AAC-2	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACGTTGCGC	2687
tDR-1:32-Val-AAC-1-M6-G26U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCC	2647
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G7A	GTTTCCATAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	2298
tDR-1:31-Val-AAC-1-M6	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGC	2274
tDR-1:32-Lys-CTT-2-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGAC	2214
tDR-1:32-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGAC	2172
tDR-1:34-Val-AAC-2-A34G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACGTTGCGCTG	2051
tDR-34:54-Gln-CTG-1-M5	CTGAATCCAGCGATCCGAGT	1981
tDR-1:36-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCC	1897
tDR-1:33-Val-CAC-2-G26A	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACATTCGCT	1843
tDR-1:33-Val-AAC-2-G26U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACTTTCGCT	1717
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U33C	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCC	1682
tDR-4:33-Lys-CTT-1-M2	CGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT	1668
tDR-2:31-His-GTG-1	CCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCG	1643
tDR-1:35-Lys-CTT-2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTCT	1640
tDR-1:34-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTTG	1584
tDR-13:49-Glu-CTC-1-M2	TAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTCACCGCCGCGGCC	1491
tDR-1:33-Gly-GCC-1-U32G	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCG	1485
tDR-1:30-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGC	1480
tDR-1:34-Val-AAC-1-M6-A34U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTT	1453
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G7C	GTTTCCCTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1446
tDR-1:35-Val-AAC-1-M6-A34U-A35G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTTG	1386
tDR-2:33-Val-AAC-1-M6	TTCGGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1322
tDR-1:37-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCCA	1289
tDR-1:32-iMet-CAT-1-M2	AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGCTGGGC	1233
tDR-1:33-Glu-CTC-1-M2-U5C-G6U	TCCCTGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCT	1193
tDR-36:72-Asp-GTC-2-M2	CACGCGGGAGACCGGGGTTGATTCCCCGACGGGA	1180
tDR-1:33-Val-CAC-2-G26C	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACCTTCGCT	1177
tDR-3:36-Gly-GCC-1	ATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCC	1172
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G26U-U33A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCCA	1156
tDR-1:36-Glu-TTC-2	TCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTTC	1100
tDR-1:36-Val-AAC-1-M6-A34G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTGAC	1056
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U4G	GTTGCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1037
tDR-4:33-Val-AAC-1-M6	TCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1032
tDR-13:42-Lys-CTT-1-M2	CAGTCGGTAGAGCATGGGACTCTTAATCCC	1031

Примечание. * Представлено общее число прочтений в пулированной библиотеке из 24 образцов.

Note. * Represents the total number of reads in a pooled library of 24 samples.

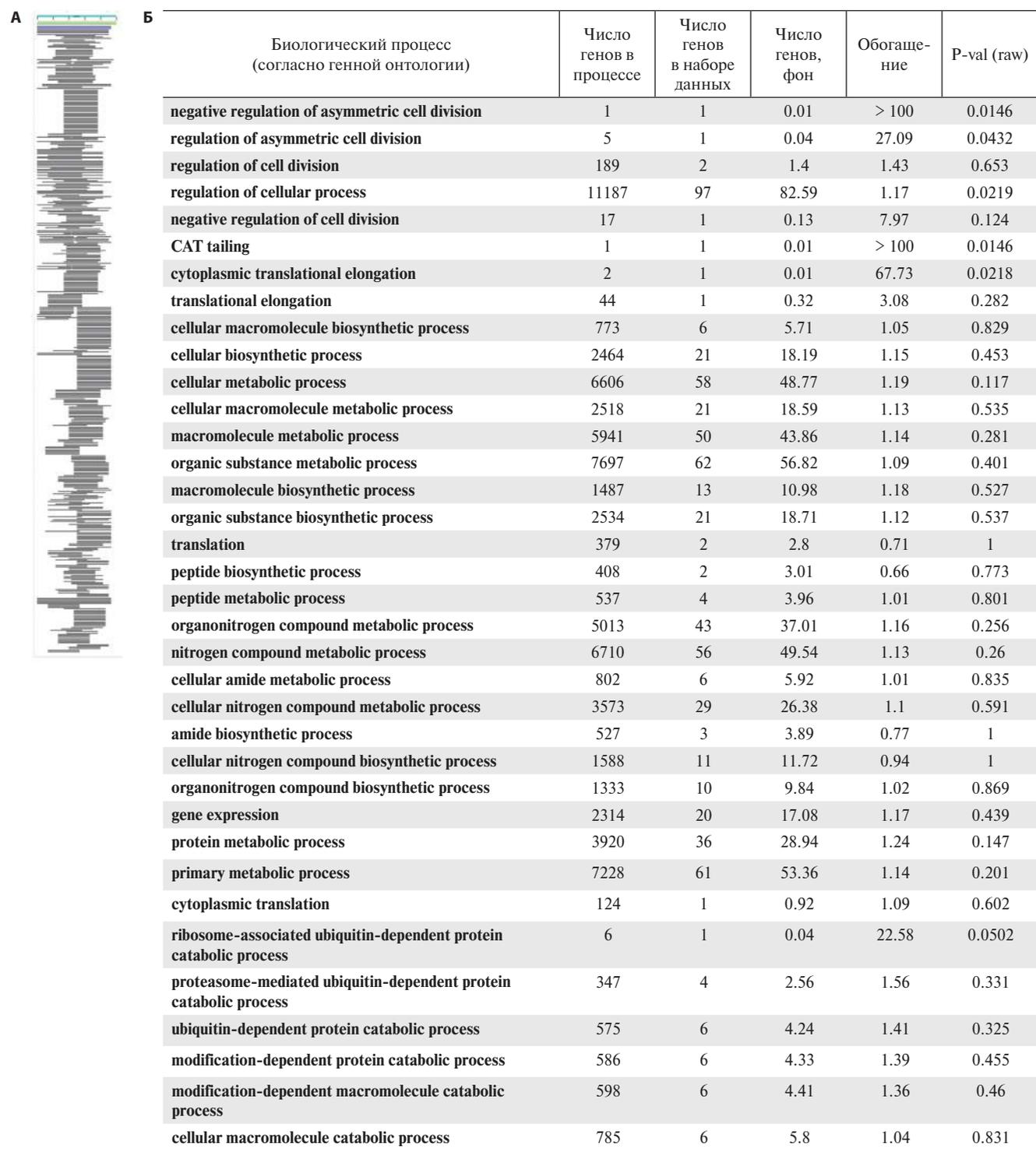


Рис. 4. А – поиск похожих последовательностей для фрагмента тРНК tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4 с помощью BLASTN в базе данных refsec RNA, показано графическое выравнивание, Б – обогащенные термины геной онтологии из категории «биологический процесс» для перечня генов с похожими последовательностями на tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4.

Fig. 4. А – search for similar sequences for the tRNA fragment tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4 using BLASTN in the refsec RNA database, graphical alignment is shown, Б – enriched gene ontology terms from the «biological process» category for list of genes with similar sequences to tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4.

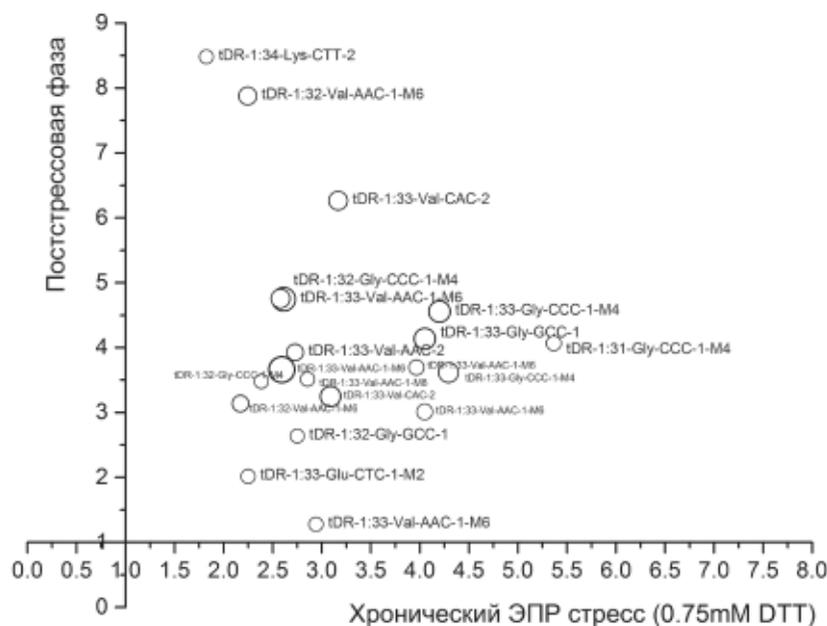


Рис. 5. Сопоставление фрагментов тРНК в клетках FRSN, подвергнутых хроническому стрессу ЭПР и в постстрессорной фазе на диаграмме рассеивания, по оси абсцисс и ординат – кратность изменения экспрессии, диаметр точек – логарифм представленности по основанию 2.

Fig. 5. Comparison of tRNA fragments in FRSN cells subjected to chronic ER stress and in the post-stress phase on the scatter diagram, the x and y axis are the fold change in expression, the diameter of the points is the logarithm of enrichment in base 2.

логичных участков как плюс, так и минус цепи ДНК для транскриптов базы refseq RNA (рис. 4, А). Это может свидетельствовать о возможности комплементарных взаимодействий со смысловыми или антисмысловыми транскриптами. В частности, в ряде работ показана ассоциация фрагментов тРНК с комплексом RISC, т.е. возможность опосредования ими РНК-интерференции, например, tRF-фрагментами [24, 28]. Анализ терминов геномной онтологии для перечня установленных гомологичных транскриптов показал ряд обогащенных процессов, таких, как negative regulation of asymmetric cell division, cytoplasmic translational elongation (рис. 4, Б). Эти процессы могут быть рассмотрены при поиске возможной функциональной роли данного фрагмента.

Нами было проведено сопоставление хронически стрессированных клеток с клетками в постстрессорной фазе. Была обнаружена близость их тРНК-фрагментов за исключением фрагментов изотипов Val, Lys (рис. 5).

Таким образом, в данной работе нами были впервые охарактеризованы тРНК фрагменты при стрессиндуцированном и репликативном старении, которые показали наличие общих дифференциально регулируемых фрагментов тРНК. Это делает их возможными

кандидатами на универсальные маркеры клеточного старения для данного типа клеток, что может в перспективе использоваться как подход для оценки динамики процессов клеточного старения.

Литература

(п.п. 1–22; 24; 26–28 см. References)

23. Кухарский М.С., Эверетт М.В., Лыткина О.А., Распопова М.А., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К. и др. Нарушение регуляции белкового гомеостаза в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. *Мол. биология*. 2022; 56(6): 1044–56. <https://doi.org/10.31857/S0026898422060143>
25. Зайченко Д.М., Микрюкова А.А., Астафьева И.Р., Малахов С.Г., Кубатиев А.А., Московцев А.А. Биогенез микроРНК при старении клеток, индуцированном хроническим стрессом эндоплазматического ретикулума. *Мол. биол.* 2023; 57(4): 670–83. <https://doi.org/10.1134/S0026893323040192>

References

1. Anderson P., Ivanov P. TRNA Fragments in Human Health and Disease. *FEBS Lett.* 2014; 588(23): 4297–304.
2. Giegé R. Toward a More Complete View of TRNA Biology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008; 15(10): 1007–14. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1498>
3. Phizicky E.M., Hopper A.K. TRNA Biology Charges to the Front. *Genes Dev.* 2010; 24(17): 1832–60. <https://doi.org/10.1101/gad.1956510>

4. Raina M., Ibba M. TRNAs as Regulators of Biological Processes. *Front. Genet.* 2014; (5): 171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00171>
5. Orellana E.A., Siegal E., Gregory R.I. TRNA Dysregulation and Disease. *Nat. Rev. Genet.* 2022; 23(11): 651–64. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00501-9>
6. Sajek M.P., Woźniak T., Sprinzl M., Jaruzelska J., Barciszewski J. T-Psi-C: User Friendly Database of TRNA Sequences and Structures. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1): D256–D260. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz922>
7. Gruber A.R., Lorenz R., Bernhart S.H., Neuböck R., Hofacker I. L. The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36 (Web Server issue): W70–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
8. Torres A.G., Batlle E., Ribas de Pouplana L. Role of TRNA Modifications in Human Diseases. *Trends Mol. Med.* 2014; 20 (6): 306–14. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.008>
9. Abe T., Inokuchi H., Yamada Y., Muto A., Iwasaki Y., Ikemura T. TRNADB-CE: TRNA Gene Database Well-Timed in the Era of Big Sequence Data. *Front. Genet.* 2014; 5: 114. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00114>
10. Chan P.P., Lowe T.M. GtRNAdb: A Database of Transfer RNA Genes Detected in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (Database issue): D93–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn787>
11. Chan P.P., Lowe T.M. GtRNAdb 2.0: An Expanded Database of Transfer RNA Genes Identified in Complete and Draft Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (D1): D184–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1309>
12. Parisien M., Wang X., Pan T. Diversity of Human TRNA Genes from the 1000-Genomes Project. *RNA Biol.* 2013; 10(12): 1853–67. <https://doi.org/10.4161/rna.27361>
13. Goodenbour J.M., Pan T. Diversity of TRNA Genes in Eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(21): 6137–46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl725>
14. Gebetsberger J., Polacek N. Slicing TRNAs to Boost Functional NcRNA Diversity. *RNA Biol.* 2013; 10(12): 1798–806. <https://doi.org/10.4161/rna.27177>
15. Sobala A., Hutvagner G. Transfer RNA-Derived Fragments: Origins, Processing, and Functions. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2011; 2(6): 853–62. <https://doi.org/10.1002/wrna.96>
16. Thompson D. M., Parker R. Stressing out over TRNA Cleavage. *Cell* 2009; 138(2): 215–9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.001>
17. Tuck A.C., Tollervey D. RNA in Pieces. *Trends Genet.* 2011; 27(10): 422–32. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.06.001>
18. 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. *Sci. Rep.* 2017; (7): 46080. <https://doi.org/10.1038/srep46080>
19. Li S., Hu G.-F. Emerging Role of Angiogenin in Stress Response and Cell Survival under Adverse Conditions. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(7): 2822–6. <https://doi.org/10.1002/jcp.23051>
20. Yamasaki S., Ivanov P., Hu G. F., Anderson P. Angiogenin Cleaves TRNA and Promotes Stress-Induced Translational Repression. *J. Cell Biol.* 2009; 185(1):. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811106>
21. Ivanov P., Emara M.M., Villen J., Gygi S.P., Anderson P. Angiogenin-Induced TRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol. Cell* 2011; 43(4): 613–23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022>
22. Emara M.M., Ivanov P., Hickman T., Dawra N., Tisdale S., Keder-sha N., et al. Angiogenin-Induced TRNA-Derived Stress-Induced RNAs Promote Stress-Induced Stress Granule Assembly. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(14): 10959–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077560>
23. 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. *Mol. Biol.* 2022; 56(6): 1044–56. <https://doi.org/10.31857/S0026898422060143> (in Russian)
24. Su Z., Kuscu C., Malik A., Shibata E., Dutta A. Angiogenin Generates Specific Stress-Induced TRNA Halves and Is Not Involved in TRF-3-Mediated Gene Silencing. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(45): 16930–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009272>
25. 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. *Mol. Biol.* 2023; 57(4): 670–83. <https://doi.org/10.1134/S0026893323040192> (in Russian)
26. Pliatsika V., Lohrer P., Magee R., Telonis A. G., Lordin E., Shigematsu M., et al. MINTbase v2.0: A Comprehensive Database for TRNA-Derived Fragments That Includes Nuclear and Mitochondrial Fragments from All The Cancer Genome Atlas Projects. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D152–D159. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1075>
27. Steinberg S., Misch A., Sprinzl M. Compilation of TRNA Sequences and Sequences of TRNA Genes. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(13): 3011–5. <https://doi.org/10.1093/nar/21.13.3011>
28. Venkatesh T., Suresh P. S., Tsutsumi R. TRFs: MiRNAs in Disguise. *Gene* 2016; 579(2): 133–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.058>

Сведения об авторах:

Зайченко Данила Михайлович, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП; мл. науч. сотр. группы медицинской биотехнологии лаб. биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБНУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ассистент каф. биологии и общей генетики медицинского института РУДН, e-mail: danilamihailovich@mail.ru;

Пасько Алексей Юрьевич, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alexihox@gmail.com; **Микрюкова Анна Алексеевна**, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП, e-mail: mikri-anya@yandex.ru;

Астафьева Яна Романовна, лаборант группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП, e-mail: yanasterr@yandex.ru; **Малахо Софья Гарифовна**, канд. биол. наук, биолог, ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» ДЗМ, e-mail: malakhosophie@gmail.com;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

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 лаб. биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБНУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru

Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А., Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Хамнагдаева Н.В.

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости

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

Развитие инфекционных осложнений у больных с воспалительными заболеваниями определяется тем, насколько эффективную защитную реакцию нейтрофилы больного будут развивать при контакте с патогеном. Противомикробная устойчивость организма во многом определяется готовностью нейтрофилов формировать нейтрофильные сети, способные эффективно захватывать патогены.

Цель исследования. Определение параметров нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости.

Методика. Обследованы 28 прооперированных больных с различными формами абдоминального воспаления и 6 терапевтических больных с язвенным колитом, 6 пациентов обследованы при поступлении. Нейтрофилы выделяли, используя градиентное центрифугирование. Для подсчета НЭЛ использовали флуоресцентную микроскопию с красителем SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Функциональную активность НЭЛ определяли в тесте с захватом *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Результаты. При исследовании больных в послеоперационном периоде обнаружили, что при остром аппендиците/абсцессе, остром холецистите и остром панкреатите/панкреонекрозе обнаруживаются близкие количества НЭЛ – $12,63 \pm 2,13\%$, $15,66 \pm 2,81\%$ и $12,64 \pm 2,73\%$. В этих же группах больных регистрируются достоверные различия в размерах НЭЛ, которые достигают $46,82 \pm 6,70$ мкм, $73,62 \pm 16,29$ мкм и $96,84 \pm 27,17$ мкм, соответственно. Увеличение размеров НЭЛ в этих группах больных объясняется присутствием, помимо сетевидных структур, дополнительно еще и нитевидных, волокнистых и вуалеобразных нейтрофильных внеклеточных структур. Группа больных с неспецифическим язвенным колитом, получающих консервативное лечение (группа сравнения), демонстрирует тенденцию к уменьшению размеров НЭЛ – до величины $31,96 \pm 14,75$ мкм. Исследование функциональной активности НЭЛ показывает, что её снижение предшествует развитию септического состояния (на примере выявленного клинического случая).

Заключение. Все, без исключения, исследованные нозологические формы воспаления в брюшной полости сопровождаются формированием НЭЛ в виде нейтрофильных сетей. Помимо нейтрофильных сетей воспаление индуцирует у части больных формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, волокон и вуалей. Количественные параметры НЭЛ коррелируют с размерами и распространением очага воспаления на соседние анатомические области. На примере описанного клинического случая обнаружено резкое ослабление функциональной активности НЭЛ, которое предшествовало развитию септического осложнения. Прослеживается связь между исходно ослабленной функциональной активностью НЭЛ и развитием септического осложнения у пациента в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: морфологическое строение нейтрофильных экстраклеточных ловушек; НЭЛ; воспаление; функциональная активность НЭЛ

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А., Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Хамнагдаева Н.В. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 15-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.15-25

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Ступин В.А.; сбор, обработка материала и постановка экспериментов – Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Рогожина Л.С.; подготовка иллюстративного материала, написание текста – Казимирский А.Н.; статистическая обработка материала – Панина М.И.; редактирование – Салмаси Ж.М., Панина М.И., Хамнагдаева Н.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Rogozhina L.S., Stupin V.A., Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Khamnagdaeva N.V.

Neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases of the abdominal cavity

Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russian Federation

The development of infectious complications in patients with inflammatory diseases is determined by how effective protective reaction the patient's neutrophils will develop upon contact with the pathogen. The body's anti-infective resistance is largely determined by the willingness of neutrophils to form neutrophilic networks capable of effectively capturing pathogens.

Aim. Determination of parameters of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with inflammatory diseases of the abdominal cavity.

Methods. 28 operated patients with various forms of abdominal inflammation and 6 therapeutic patients with ulcerative colitis were examined, 6 patients were examined upon admission. Neutrophils were isolated using gradient centrifugation. To calculate the NETs, fluorescence microscopy with the dye SYBR Green (Evrogen; Russia), which specifically interacts with double-stranded DNA, was used. The functional activity of NETs was determined in the *Klebsiella pneumoniae* capture test (ATCC 700603).

Results. In the study of patients in the postoperative period, it was found that in acute appendicitis/abscess, acute cholecystitis and acute pancreatitis/pancreonecrosis, similar amounts of NETs are found – $12,63 \pm 2,13\%$, $15,66 \pm 2,81\%$ and $12,64 \pm 2,73\%$. In the same groups of patients, significant differences in the size of the NETs are recorded, which reach $46,82 \pm 6,70$ microns, $73,62 \pm 16,29$ microns and $96,84 \pm 27,17$ microns, respectively. The increase in the size of the NETs in these groups of patients is explained by the presence, in addition to network-like structures, additionally filamentous, fibrous and cloud-like neutrophil extracellular structures. A group of patients with nonspecific ulcerative colitis receiving conservative treatment (comparison group) shows a tendency to decrease the size of the NEL to a value of $31,96 \pm 14,75$ microns. A study of the functional activity of NETs shows that its decrease precedes the development of a septic condition (using the example of an identified clinical case).

Conclusion. All, without exception, the studied nosological forms of inflammation in the abdominal cavity are accompanied by the formation of NETs in the form of neutrophilic networks. In addition to neutrophilic networks, inflammation induces the formation of NETs in the form of single strands, fibers and clouds form in some patients. The quantitative parameters of the NETs correlate with the size and spread of the inflammatory focus to neighboring anatomical areas. On the example of the described clinical case, a sharp decrease in the functional activity of NETs was found, which preceded the development of a septic complication. There is a connection between the initially weakened functional activity of NETs and the development of septic complications in the patient in the postoperative period.

Keywords: morphological structure of neutrophil extracellular traps; NETs; inflammation; functional activity of NETs

For citation: Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Rogozhina L.S., Stupin V.A., Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Khamnagdaeva N.V. Neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases of the abdominal cavity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 15–25. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.15-25

Authors' contribution: the concept and design of the study – Poryadin G.V., Salmasi J.M., Stupin V.A.; collection, processing of material and staging of experiments – Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Rogozhina L.S.; preparation of illustrative material, writing the text – Kazimirskii A.N.; statistical processing of material – Panina M.I.; editing the text – Salmasi J.M., Panina M.I., Khamnagdaeva N.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Information about the authors:

Kazimirskii A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Salmasi J.M., <https://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

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

Panina M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

Rogozhina L.S., <https://orcid.org/0000-0002-3983-7890>

Stupin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-9522-8061>

Kim A.E., <https://orcid.org/0000-0001-8119-772X>

Titova E.G., <https://orcid.org/0000-0002-1655-322X>

Turishcheva O.O., <https://orcid.org/0009-0009-6000-9131>

Khamnagdaeva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-1167-9226>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 10.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

В основе инициации запуска защитных систем организма лежит формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ, NETs). Эти внеклеточные структуры, образованные ядерной ДНК вместе с некоторыми белками хроматина и ферментами, формируются в ответ на присутствие в организме практически любых патогенов (вирусов, бактерий и других микроорганизмов). Морфологические характеристики формирующихся НЭЛ, их количество и размеры, а также их функциональная активность могут предопределять характер течения, тяжесть заболевания и риск развития инфекционных осложнений у больных.

Цель – определение параметров нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у прооперированных больных по поводу воспалительных процессов в брюшной полости, а также исследование функциональной активности НЭЛ отдельных больных, поступающих на госпитализацию в хирургический стационар.

Методика

Пациенты. В исследование включены больные, находящиеся на лечении в 51 ГКБ г. Москвы с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости. Были обследованы 28 больных после проведенного хирургического вмешательства (8 больных с острым аппендицитом, 8 больных с острым холециститом, 6 больных с диагнозом панкреатит/панкреонекроз, 6 больных с перитонитом) и 6 больных, находящихся на консервативном лечении с диагнозом язвенный колит. В исследование были также включены больные (6 человек), поступившие на госпитализацию, как на плановые операции, так и по экстренным показаниям.

Методы. Определение содержания нейтрофильных экстраклеточных ловушек

Получение клеточных фракций нейтрофилов

Для взятия проб крови использовали вакуутайнер с ЭДТА для предотвращения свертывания. Выделение нейтрофилов из венозной крови, обработанной ЭДТА, проводили традиционным методом с помощью градиентного центрифугирования. Для этого кровь разводили в 4 раза натрий-фосфатным буферным раствором 50 мМ, рН 7,4, и наслаивали на двойной градиент плотности фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,077 г/см³,

а нижнего – 1,190 г/см³. После центрифугирования (1600 об./мин, 30 мин) на границе между градиентами возникает скопление нейтрофилов с чистотой 98–100%. Нейтрофилы дважды отмывали от примесей фиколла натрий-фосфатным буферным раствором (50 мМ, рН 7,4). Осаждение клеток крови проводили при центрифугировании (1200 об./мин, 15 мин). Выделенные нейтрофилы в среде RPMI-1640 использовали в экспериментах по кратковременному культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 95% (тест с 0,1% раствором трипанового синего).

Иммунофлюоресцентное определение нейтрофильных экстраклеточных ловушек

Для обнаружения и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флюоресцентную микроскопию [1]. Выявление нейтрофильных экстраклеточных ловушек осуществляли с использованием флюоресцентного красителя SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Микроскопирование, подсчет и фоторегистрацию клеток и экстраклеточных структур проводили при увеличении 1000. Результаты выражали в процентах, в виде отношения количества экстраклеточных ловушек к общему числу клеток в поле зрения.

Захват тестового микроорганизма

Определение функциональной активности нейтрофильных внеклеточных структур проводили с помощью теста на захват микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Для этого к нейтрофилам, иммобилизованным на стекле, покрытом полилизинном, добавляли микробную культуру *Klebsiella pneumoniae* в среде RPMI-1640 в концентрации 10³/мкл. Нейтрофильные сети захватывали тестовый микроорганизм в соответствии с потенциальной функциональной активностью НЭЛ. После окрашивания (SYBR Green, 15 мин) и отмыкания избытка красителя в ходе микроскопирования определяли количество клеток *Klebsiella pneumoniae*, связанное каждой экстраклеточной структурой.

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали в программе *Statistica 12.0 (StatSoft, Inc)*. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартная ошибка среднего (m). Сравнение количественных признаков проводили по ранговому U критерию Манна-Уитни и данным дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования морфологических параметров НЭЛ в группах больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости в соответствии с нозологической формой воспалительного процесса

Ни один из нами обследованных больных, госпитализированных для хирургического лечения с острым инфекционным воспалением в брюшной полости, не показал инфекционных осложнений в послеоперационном периоде. Все больные находились в удовлетворительном состоянии средней степени тяжести. Количество НЭЛ незначительно изменяется у нескольких групп больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости. Исследование нейтрофильных экстраклеточных ловушек показывает, что достоверные различия в размерах НЭЛ обнаружены при

сравнении больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом (табл. 1).

Относительное количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек при различных нозологических формах острых воспалительных процессов в послеоперационном периоде оказывается сходным. Так, при остром аппендиците/абсцессе, остром холецистите и остром панкреатите/панкреонекрозе обнаруживаются близкие количества НЭЛ – 12,63±2,13%, 15,66±2,81% и 12,64±2,73%, соответственно. Острые локальные воспалительные процессы в брюшной полости сопровождаются формированием НЭЛ в диапазоне 12-15%. Однако, у больных с распространенным воспалением серозных оболочек брюшной полости (перитонит) в послеоперационном периоде наблюдалась тенденция к увеличению численности НЭЛ до уровня 18,40±4,02%. Результаты по определе-

Таблица 1/Table 1

Лабораторные показатели и параметры нейтрофильных экстраклеточных ловушек больных с воспалительными процессами в брюшной полости

Laboratory parameters and parameters of neutrophil extracellular traps in patients with inflammatory processes in the abdominal cavity

Нозологическая форма воспалительного процесса The nosological form of the inflammatory process	Возраст больных, лет Age of patients, years	День исследования Research Day	Количество лейкоцитов x10 ⁹ /л White blood cell count x10 ⁹ /l	С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein,mg/l	НЭЛ, % NETs, %	Размеры НЭЛ, мкм Sizes NETs, microns
после оперативного вмешательства after surgery						
Острый аппендицит/абсцесс Acute appendicitis/abscess (n=8)	44,57±6,09	5,75±1,27	9,41±1,04	101,37±41,97	12,63±2,13	46,82±6,70*
Острый холецистит Acute cholecystitis (n=8)	51,75±5,97	5,80±1,68	10,35±2,15	44,33±22,76	15,66±2,81	73,62±16,29*
Острый панкреатит/ панкреонекроз Acute pancreatitis/ pancreonecrosis (n=6)	50,25±2,01	10,0±2,40	12,34±2,43	177,0±54,11	12,64±2,73	96,84±27,17*
Перитонит Peritonitis (n=6)	40,00±2,79	5,80±1,20	9,70±1,66	152,0±35,63	18,40±4,02	40,62±10,32
консервативное лечение conservative treatment						
Язвенный колит Ulcerative colitis (n=6)	50,33±13,19	5,33±1,45	6,83±0,73	43,00±2,76	11,30±2,92	31,96±14,75

Примечание. * – p<0,05 по данным дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса, с дополнительным попарным сравнением группы больных с диагнозом острый аппендицит с двумя другими группами больных (острый холецистит и острый панкреатит).

Note. * – p<0.05 according to the Kruskal-Wallis analysis of variance, with an additional pairwise comparison of a group of patients diagnosed with acute appendicitis with two other groups of patients (acute cholecystitis and acute pancreatitis).

нию количества НЭЛ показывают, что количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек зависит от размеров очага воспаления и его распространения на соседние анатомические области.

Размеры НЭЛ (в мкм) в исследованных группах больных оказываются различными, по данным дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса. При остром аппендиците, остром холецистите, остром панкреатите регистрируется достоверное увеличение размеров НЭЛ, которые достигают $46,82 \pm 6,70$ мкм, $73,62 \pm 16,29$ мкм и $96,84 \pm 27,17$ мкм, соответственно, при попарном сравнении результатов, полученных у больных с диагнозом острый аппендицит с двумя другими группами больных (острый холецистит, острый панкреатит).

Достоверное увеличение размеров НЭЛ в этих группах больных (больные с острым холециститом, и острым панкреатитом) по сравнению с группой больных с диагнозом острый аппендицит объясняется присутствием, помимо сетевидных структур, дополнительно еще и нитевидных, волокнистых и вуалеобразных нейтрофильных внеклеточных образований. У больных же с перитонитом размеры НЭЛ испытывают тенденцию к снижению и регистрируются в диапазоне $40,62 \pm 10,32$ мкм. Группа больных с неспецифическим язвенным колитом, получающих консервативное лечение, избранная в пределах настоящего исследования как группа сравнения, демонстрирует тенденцию к еще большему уменьшению размеров НЭЛ — до величины $31,96 \pm 14,75$ мкм.

Оценка морфологического строения НЭЛ у больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях человека представлены в виде 4-х форм: сетевидной (это главная, функционально активная форма), нитевидной, волокнистой и вуалеобразной. Преобладающими морфологическими формами НЭЛ являются сетевидные структуры и нитевидные. НЭЛ в форме сети волокон ДНК образуется при контактных взаимодействиях нейтрофила и патогена, кроме того, структура сети формируется при контакте нейтрофила с апоптозирующими клетками организма, гибнущими в результате инфицирования [2]. НЭЛ в форме одиночных нитей формируется при контактных взаимодействиях нейтрофила с фибробластами и может служить маркером асептического воспаления [1]. Волокнистые и вуалеобразные структуры НЭЛ являются производными от сетей и нитей, которые образуются в организме, вероятно, под действием IgG, который не находит соответствующих клеток-мишеней [3].

Морфологические особенности нейтрофильных экстраклеточных структур у обследованных нами больных демонстрируют определенную связь с диагностированными у них нозологическими формами воспалительных процессов в брюшной полости.

1. При остром аппендиците регистрируются исключительно НЭЛ в морфологической форме сетей.

2. В случаях осложненного (абсцессом) аппендицита помимо сетевидных структур наблюдаются также

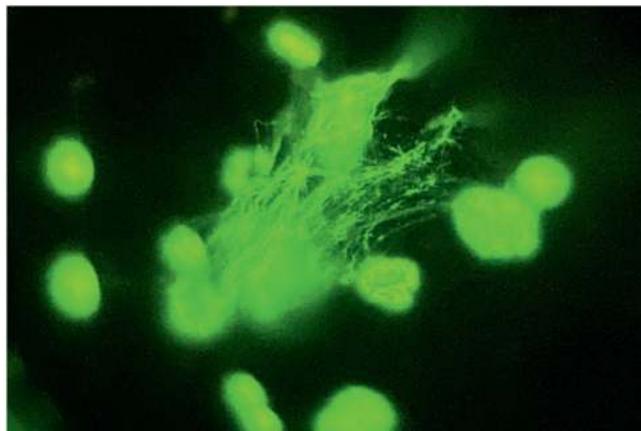


Рис. 1. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей. Неосложненный аппендицит после хирургического вмешательства.

Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. $\times 1000$.

Fig. 1. Neutrophil extracellular traps in the morphological form of neutrophilic networks. Uncomplicated appendicitis after surgery.

Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. $\times 1000$.



Рис. 2. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме одиночных нитей и волокон. Острый холецистит (после оперативного вмешательства). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. $\times 1000$.

Fig. 2. Neutrophil extracellular traps in the morphological form of single strands and fibers. Acute cholecystitis (after surgery). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. $\times 1000$.

дополнительно минимальные количества нитевидных, волокнистых и вуалеобразных форм (рис. 1).

3. У больных с острым холециститом после оперативного вмешательства в подавляющем большинстве случаев наблюдаются сети, но в половине случаев наблюдаются сети совместно с одиночными нитями и волокнами (рис. 2, 3).



Рис. 3. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных волокон. Острый холецистит (после оперативного вмешательства). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 3. Neutrophil extracellular traps in the morphological form of neutrophil fibers. Acute cholecystitis (after surgery). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. × 1000.

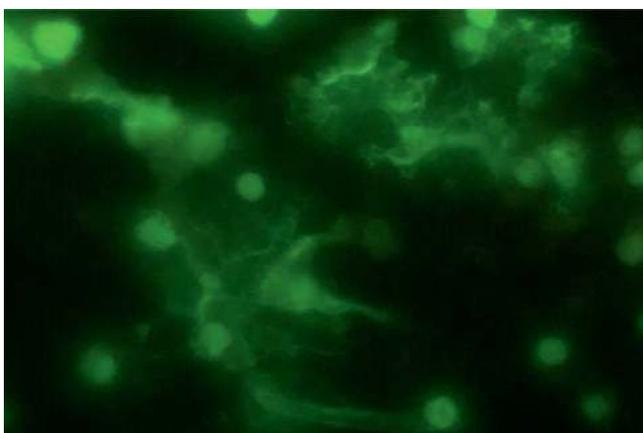


Рис. 4. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в вуалеобразной форме. Перитонит.

Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 4. Neutrophil extracellular traps in a cloud form. Peritonitis. Incubation time is 1 hour.

Coloring CYBR Green. × 1000.

4. При остром панкреатите/панкреонекрозе во всех случаях регистрировали нейтрофильные сети совместно с одиночными нитями, волокнами и вуалиями.

5. У больных с перитонитом ведущая структура НЭЛ это вуали. Сетевидные формы тоже присутствуют в небольшом количестве (около 10% от общего количества нейтрофильных экстраклеточных структур), встречаются также волокна (рис. 4).

6. При язвенном колите присутствуют нейтрофильные сети небольшого размера. Обнаруживается значительное количество вуалеобразных форм.

Результаты этого раздела исследования показывают, что, несмотря на отсутствие достоверных различий в количественных характеристиках НЭЛ у больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости, различия, тем не менее, выявляются на уровне морфологического строения НЭЛ.

Основные морфологические формы нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с воспалительными заболеваниями в брюшной полости

Результаты этого экспериментального раздела (табл. 2) показывают, что оценка морфологического строения НЭЛ у больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости может быть полезной при дифференциальной диагностике заболевания. Эта оценка не носит абсолютного характера, но может найти применение для определения тяжести текущего воспалительного процесса и выявления осложнений.

Мы предполагаем, что применение нашего метода визуализации детальной структуры НЭЛ позволит выявить скрытые осложнения, что повысит эффективность проводимого лечения.

Результаты индивидуальных измерений параметров НЭЛ и их функциональной активности у отдельных больных при поступлении на госпитализацию

Прогнозирование риска инфекционных осложнений у хирургических больных в послеоперационном периоде представляет собой актуальную и полностью не решенную проблему.

Для практикующих врачей-хирургов в качестве критериев прогнозирования развития таких осложнений у хирургических больных после оперативного вмешательства предложено много различных методик. Существующие методы оценки и прогноза опираются на текущее клиническое состояние больных, параметры адаптивного иммунитета (активность Т-лимфоцитов, содержание иммуноглобулинов и белков комплемента), уровни некоторых ферментов липидно-

го обмена. Хирургические процедуры, как известно, приводят к увеличению количества потенциально патогенных бактерий в организме пациентов [4] и часто вызывают формирование иммунодефицита в послеоперационном периоде.

Непрерывно идут поиски наиболее эффективных маркеров для прогнозирования инфекционных осложнений в послеоперационном периоде. К их числу в последнее время относят показатель отношения нейтрофилов/лимфоциты (NLR), которое может указывать на развитие послеоперационных инфекционных осложнений [5]. В некоторых сообщениях предлагают в качестве такого маркера использовать отношение лимфоциты/моноциты (LMR). Получены данные о том, что соотношение лимфоцитов к моноцитам (LMR) также является независимым показателем отдаленных результатов после хирургических операций [6]. Сообщают, что послеоперационное определение прокальцитонина может быть маркером для прогнозирования послеоперационных инфекционных осложнений после хирургических вмешательств [7]. Тем не менее, в клинической практике уровень С-реактивного белка остается наиболее востребованным показателем ответа острой фазы у хирургических больных и традиционно применяется в клинике как для оценки тяжести состояния больных, так и в качестве маркера риска осложнений в послеоперационном периоде [8, 9]. Общая

особенность перечисленных методов прогнозирования риска развития инфекционных осложнений состоит в том, что все они используют параметры оценки системного ответа острой фазы в организме больного. Однако, указанные методы прогнозирования риска инфекционных осложнений не позволяют уточнить, какой будет защитная реакция клеточного звена врожденного иммунитета (нейтрофилов) при поступлении патогена в организм больного.

Общепризнанным является факт, что инфекционные осложнения являются наиболее частыми среди всех осложнений в послеоперационном периоде, однако отсутствие четко обоснованной иммунологической концепции не позволяет заранее прогнозировать, а затем и интерпретировать возникающие при мониторинге осложнения, что затрудняет предложения стратегий вмешательства [10].

Вместе с тем, нам представляется, что наиболее эффективный подход к решению этой проблемы может состоять в том, чтобы подвергать оценке процесс, лежащий в основе инициации и запуска противоинфекционного ответа организма.

Задача запуска противоинфекционного ответа организма на вторгающуюся инфекцию возложена на систему врожденного иммунитета. Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты/макрофаги), снабженные рецепторами врожденного иммунитета

Таблица 2/Table 2

Преобладающие морфологические формы НЭЛ у больных при различных нозологических формах воспалительного процесса в брюшной полости

The predominant morphological forms of NETs in patients with various nosological forms of the inflammatory process in the abdominal cavity

Нозологическая форма воспалительного процесса The nosological form of the inflammatory process	Сети Networks	Одиночные нити Single Threads	Волокна Fibers	Вуали Clouds
Острый аппендицит, неосложненный Acute appendicitis, uncomplicated	++++	-	-	-
Острый аппендицит, осложненный абсцессом Acute appendicitis complicated by an abscess	+++	+	+	+
Острый холецистит Acute cholecystitis	++	+	+	-
Острый панкреатит/панкреонекроз Acute pancreatitis/pancreonecrosis	+	+	+	+
Перитонит Peritonitis	+	-	+	++
Язвенный колит Ulcerative colitis	+	-	-	+++

Примечание. +++++ – значительное количество нейтрофильных экстраклеточных структур;

+ – минимальное (менее 10% от общего количества) нейтрофильных экстраклеточных структур.

Note. +++++ – a significant number of neutrophil extracellular structures; + – minimum (less than 10% of the total) neutrophil extracellular structures.

(TLR), распознают патогены, формируют нейтрофильные экстраклеточные ловушки, захватывают, удерживают и повреждают патоген за счет действия активных форм кислорода и некоторых других факторов.

В пределах настоящего исследования помимо морфологических параметров НЭЛ определяли также и функциональную активность НЭЛ у отдельных больных. Функциональная активность НЭЛ это их

способность захватывать и связывать патогены. В качестве тестового микроорганизма, который добавляли к нейтрофилам, выделенным у больных, использовали клетки *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). После распознавания и захвата патогена нейтрофильные сети развивают ретракцию волокон сети и приобретают вуалеобразную форму, в центре которой локализованы клетки патогена.

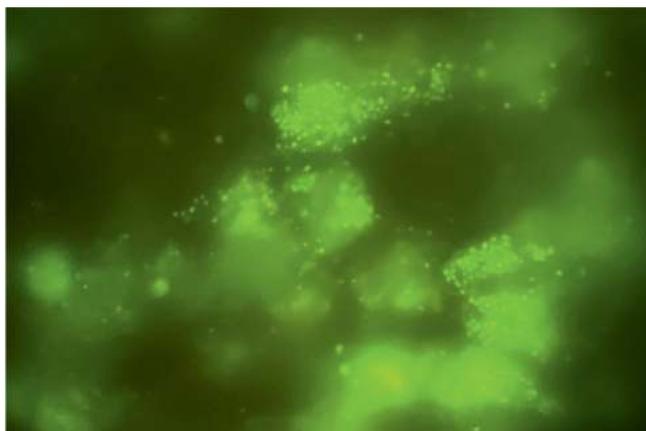


Рис. 5. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в вуалеобразной форме. Неоперированная грыжа (больной № 1). Высокая связывающая способность нейтрофильных экстраклеточных структур к захвату патогена *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 5. Neutrophil extracellular traps in a clouds form. An unoperated hernia (patient No. 1). High binding ability of neutrophil extracellular structures to capture the pathogen *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. × 1000.

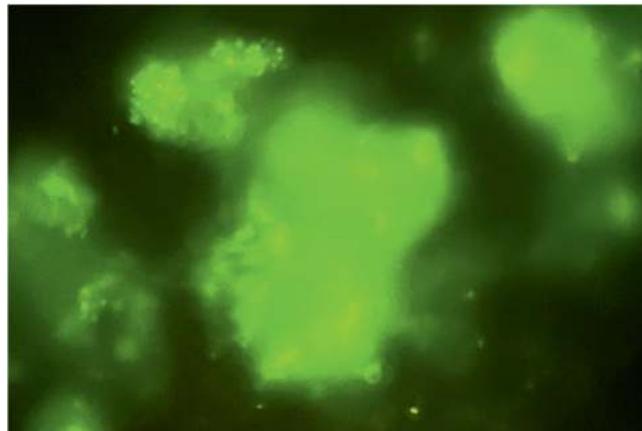


Рис. 6. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в вуалеобразной форме. Перитонит (больной № 6). Ослабление патоген-связывающей способности нейтрофильных экстраклеточных структур к захвату *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 6. Neutrophil extracellular traps in a clouds form. Peritonitis (patient No. 6). Weakening of the pathogen-binding ability of neutrophil extracellular structures to capture *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. × 1000.

Таблица 3/ Table 3

Клиническо-лабораторные показатели больных, поступивших за один день

Clinical and laboratory indicators of patients admitted in one day

№	Возраст, лет Age, years	Диагноз Diagnosis	Общее состояние Patient's condition	Количество лейкоцитов ×10 ⁹ /л Leukocyte count ×10 ⁹ /l	С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/l
1.	42	Пупочная грыжа Umbilical hernia	Удовлетворительное Satisfying	-	-
2.	42	Паховая грыжа Inguinal hernia	Средней тяжести Moderate severity	-	-
3.	62	Панкреатит, панкреонекроз Pancreatitis, pancreatic roses	Тяжелое Serious condition	6,2	155
4.	28	Перитонит Peritonitis	Средней тяжести Moderate severity	16,3	115
5.	33	Перитонит Peritonitis	Средней тяжести Moderate severity	14,0	71
6.	49	Перитонит Peritonitis	Средней тяжести Moderate severity	14,5	71

Функциональная активность нейтрофилов, полученных от больных, тем выше, чем больше клеток *Klebsiella pneumoniae* захватывают и удерживают нейтрофильные внеклеточные структуры. В таблице 3 приводятся клинико-лабораторные показатели отдельных больных, поступивших на госпитализацию за один день.

Нами было выявлено, что, несмотря на различное по степени тяжести состояние обследованных больных при поступлении в стационар, количественные параметры их НЭЛ (численность и размеры) не показали значительных отличий. Так, количество НЭЛ у всех больных соответствует диапазону 10-14%, а их размеры изменяются от 40 до 64 мкм.

Функциональная активность НЭЛ у обследованных больных оказалась различной. Так, неоперированные больные с пупочной и паховой грыжей (№ 1 и 2) показали высокую связывающую способность патогена нейтрофильными сетями на уровне 43-44 клеток тестового микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* на одну нейтрофильную сеть. Больной с панкреатитом/панкреонекрозом (№ 3), а также двое больных с перитонитом (№ 4 и 5) также показали довольно высокую способность нейтрофильных внеклеточных сетей к захвату и связыванию клеток тестового микроорганизма, лежащую в диапазоне 20-25 клеток на одну сеть (рис. 5). Дальнейшие клинические наблюдения за состоянием этих больных (№ 1-5) не зарегистрировали развития инфекционных осложнений у них в послеоперационном периоде.

Однако, у больного № 6, который при поступлении имел умеренное значение С-реактивного белка, нами было выявлено резкое ослабление функциональной активности нейтрофилов (рис. 6). В среднем, его нейтрофильные внеклеточные структуры связывали только 8 клеток патогена. Это показатель был в 5 раз ниже, чем у других поступивших в этот день больных с неоперированной грыжей, в 3 раза ниже, чем у тяжелого больного с диагнозом панкреатит/панкреонекроз (№ 3) и также по сравнению с другими больными с диагнозом перитонит (№ 4 и 5). Дальнейшие наблюдения за динамикой состояния больных в ходе стационарного лечения показали, что состояние этого больного (№ 6) через 2 дня послеоперационного периода резко ухудшилось, и развилось осложнение в виде острого септического процесса, сопровождающегося высокой лихорадкой. Этот пациент в дальнейшем продолжал лечение в отделении интенсивной терапии. Тщательное клинико-лабораторное и инструментальное обследование этого пациента в отделении не выявило причину столь тяжелого инфекционного

осложнения. Мы полагаем, что причина осложнения в виде септического процесса у данного пациента может быть связана с предшествующим резким снижением функциональной активности НЭЛ.

Заключение

Приоритетная концепция настоящего исследования предполагает признание того, что в основе инициации запуска защитных систем организма лежит формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (NETs, НЭЛ) при поступлении патогенов в организм человека. Эти структуры способны захватывать и удерживать патогены, подвергая их при этом повреждению и инактивации. Впоследствии развивается фагоцитоз, сопряженный с внутриклеточным гидролизом патогенов и фрагментов нейтрофильных сетей. В результате этих начальных иницирующих процессов происходит презентация антигенов, которая позволяет включить в ответную защитную реакцию систему адаптивного иммунитета. Результаты проведенного исследования впервые демонстрируют разнообразие морфологических структур нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости.

Главной, функционально активной структурой НЭЛ является сетевидная морфологическая форма, которая способна эффективно захватывать и удерживать патогены. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в форме нейтрофильных сетей обнаружены нами при всех исследованных нозологических формах инфекционного воспаления в брюшной полости. Дополнительно обнаруживаются некоторые другие морфологические нейтрофильные структуры – нитевидные, волокнистые и вуалеобразные. Обнаружение сочетания главной сетевидной нейтрофильной структуры с дополнительными нейтрофильными структурами может быть положено в основу дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний брюшной полости.

Количественные параметры НЭЛ (их численность) при изученных заболеваниях оказывается сходным, а различия проявляются в виде тенденции. Наиболее заметные различия обнаружены при сравнении острого локального воспаления (аппендицит) и распространенного (перитонит), что позволяет сделать заключение о том, что количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек определяется размерами и распространенностью очага воспаления на соседние анатомические области. Данные других исследователей, проводивших подобные исследования, выявляют зависимость численности НЭЛ от тяжести заболевания.

Впервые проведена оценка размеров НЭЛ у больных с различными нозологическими формами абдоминального воспаления и выявлены различия при локальном, отграниченном и распространенном воспалительных процессах в брюшной полости.

При локальном воспалении размеры НЭЛ последовательно достоверно увеличиваются в ряду «острый аппендицит, острый холецистит, острый панкреатит» за счет присоединения дополнительных нитевидных и волокнистых нейтрофильных структур.

При распространенном неотграниченном воспалении в брюшной полости (перитонит) размеры нейтрофильных сетей испытывают тенденцию к снижению.

Наиболее существенные результаты получены при исследовании функциональной активности нейтрофильных сетей у отдельных больных, поступающих на госпитализацию. Результаты показывают, что выявление ослабления функциональной активности нейтрофильных сетей может быть использовано в качестве критерия для прогнозирования возможных инфекционных осложнений в послеоперационном периоде.

Выводы

1. Все, без исключения, исследованные нозологические формы воспаления в брюшной полости сопровождаются формированием НЭЛ в виде нейтрофильных сетей.

2. Помимо нейтрофильных сетей воспаление индуцирует у части больных формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, волокон и вуалей.

3. Количественные параметры НЭЛ коррелируют с размерами и распространением очага воспаления на соседние анатомические области.

4. На примере описанного клинического случая обнаружено резкое ослабление функциональной активности НЭЛ, которое предшествовало развитию септического осложнения. Прослеживается связь между исходно ослабленной функциональной активностью нейтрофильных экстраклеточных ловушек и развитием септического осложнения у пациента в послеоперационном периоде.

Соответствие принципам этики. Исследование проб крови проводили на кафедре патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Все процедуры выполнялись в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации ВМА (в редакции 2004 г.) и письменного информированного согласия пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» (Протокол № 203 от 21.12.2021 г.)

Литература (п.п. 4–10 см. References)

1. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 34–42. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>
2. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19. *Вестник РГМУ.* 2020; (5): 5–14. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.054>
3. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Ступин В.А. и др. IgG стимулирует образование внеклеточных ловушек нейтрофильных клеток и изменяет их структуру. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023; 174 (6): 806-9. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05794-2>

References

1. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I. New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya.* 2022; 66(2): 34-42. (in Russian) <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>
2. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V. Antiviral system of innate immunity: COVID-19 pathogenesis and treatment. *Vestnik RGMU.* 2020; (5): 5-13. (in Russian) <https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.054>
3. Kazimirskii A.N., Salmasi Zh.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Stupin V.A., et al. IgG Stimulates the Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Modifies Their Structure. *Bull Exp Biol Med.* 2023; 174(6): 806-9. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05794-2>
4. Lederer A.K., Pisarski P., Kousoulas L., Fichtner-Feigl S., Hess C., Huber R. Postoperative changes of the microbiome: are surgical complications related to the gut flora? A systematic review. *BMC Surg.* 2017; 17(1): 125. <https://doi.org/10.1186/s12893-017-0325-8>
5. Mohri Y., Tanaka K., Toiyama Y., Ohi M., Yasuda H., Inoue Y., et al. Impact of Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Postoperative Infectious Complications on Survival After Curative Gastrectomy for Gastric Cancer: A Single Institutional Cohort Study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(11): e3125. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003125>
6. Kamonvarapitak T., Matsuda A., Matsumoto S., Jamjitrong S., Sakurazawa N., Kawano Y., et al. Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio predicts postoperative infectious complications after laparoscopic colorectal cancer surgery. *Int J Clin Oncol.* 2020; 25(4): 633-40. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01583-y>
7. Vasavada B., Patel H. Postoperative serum procalcitonin versus C-reactive protein as a marker of postoperative infectious complications in pancreatic surgery: a meta-analysis. *ANZ J Surg.* 2021; 91(5): E260-E270. <https://doi.org/10.1111/ans.16639>
8. Medina-Fernández F.J., Garcilazo-Arismendi D.J., García-Martín R., Rodríguez-Ortiz L., Gómez-Barbadillo J., Gallardo-Valverde J.M., et al. Validation in colorectal procedures of a useful novel approach for the use of C-reactive protein in postoperative infectious complications. *Colorectal Dis.* 2016; 18(3): O111-O118. <https://doi.org/10.1111/codi.13284>

9. Řezáč T., Stašek M., Zbořil P., Špička P. The role of CRP in the diagnosis of postoperative complications in rectal surgery. *Pol Przegl Chir.* 2021; 93(5):1-7. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.6591>. PMID: 34552029
10. Sousa Á.F.L., Bim L.L., Hermann P.R.S., Fronteira I., Andrade D. Late postoperative complications in surgical patients: an integrative review. *Rev Bras Enferm.* 2020; 73(5): e20190290. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0290>

Сведения об авторах:

Казимирский Александр Николаевич, доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. отдела молекулярных технологий, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: alnica10@mail.ru;

Салмаси Жан Мустафаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: profjms@yandex.ru;

Порядин Геннадий Васильевич, член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: poryadin_GV@rsmu.ru;

Панина Марина Ивановна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: pan-mar@list.ru;

Рогожина Людмила Сергеевна, ассистент каф. госпитальной хирургии № 1, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: lusy-090909@yandex.ru;

Ступин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф. каф. госпитальной хирургии № 1 лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: stvictor@bk.ru;

Ким Анна Эрнестовна, ассистент каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: infoany@mail.ru;

Титова Екатерина Геннадиевна, ст. преподаватель, каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: Ека-gen@mail.ru;

Турищева Ольга Олеговна, канд. мед. наук., ст. преподаватель каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: turishevaolia@mail.ru;

Хамназдаева Надежда Вениаминовна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии и клинической патофизиологии ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: lyssa_ash@mail.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092.9

Беда Е.Е.¹, Габитов М.В.², Гребенчиков О.А.¹

Влияние ксенона в различных концентрациях на объём поражения головного мозга и выраженность неврологических нарушений у крыс при моделировании открытой черепно-мозговой травмы

¹Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2;

²Главное производственно-коммерческое управление по обслуживанию дипломатического корпуса при Министерстве иностранных дел Российской Федерации Филиал «Мединцентр», 119049, Москва, 4-й Добрынинский пер., д. 4

Введение. Черепно-мозговая травма — основной источник заболеваемости и смертности во всем мире. Ежегодно в России более 100 тыс. человек теряют работоспособность и становятся инвалидами в результате ЧМТ. **Цель работы** — оценка эффективности ксенона в концентрациях 0,25 и 0,5 МАК на объём поражения головного мозга и выраженность неврологических нарушений у крыс при моделировании открытой ЧМТ.

Методика. Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar, разделенных на 4 группы: 1) ложнооперированные 2) контрольная группа 3) опытная группа с ОЧМТ + ингаляция iXe70% 4) опытная группа с ОЧМТ + ингаляция iXe35%. Оценивали неврологический статус и объём поражения головного мозга.

Результаты. Объём повреждения головного мозга крыс в контрольной группе составил 58,5 мм³. Объём повреждения во 2-й и 3-й группе составил 60,5 мм³ и 36,9 мм³ соответственно. Ингаляция ксенона 70 об.% в течение 60 мин уменьшало объём поражения головного мозга на 40% ($p = 0,01$). Объём повреждения головного мозга у ложнооперированных крыс составил 21,5 мм³, что значительно меньше, чем в группе контроля ($p = 0,005$) и группе леченных животных ($p = 0,04$). Объём повреждения мозга во 2-й и 4-й группе составил 57,4 мм³ и 40,5 мм³, соответственно. Ингаляция ксенона 35 об.% в течение 60 мин на 30% уменьшало объём поражения головного мозга ($p = 0,03$). Объём повреждения головного мозга у ложнооперированных крыс составил 21,5 мм³, что значительно меньше, чем в группе контроля ($p = 0,001$) и группе леченных животных ($p = 0,02$).

Заключение. Выполненное исследование свидетельствует о высокой эффективности терапии ксеноном после открытой ЧМТ у крыс.

Ключевые слова: ксенон; нейропротекторный эффект; ЧМТ; крысы

Для цитирования: Беда Е.Е., Габитов М.В., Гребенчиков О.А. Влияние ксенона в различных концентрациях на объём поражения головного мозга и выраженность неврологических нарушений у крыс при моделировании открытой черепно-мозговой травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(1): 26-36.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.26-36

Для корреспонденции: Габитов Михаил Валерьевич, e-mail: gabitovmv@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена по теме НИР «Молекулярные механизмы действия инертных газов при тяжелых повреждениях головного мозга и клинико-экспериментальное обоснование применения их нейроцитопротективных свойств в анестезиологии-реаниматологии» (№ FGWS – 2022-0002).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гребенчиков О.А.; сбор и обработка материала – Беда Е.Е.; подготовка иллюстративного материала – Беда Е.Е.; написание текста – Беда Е.Е.; редактирование – Гребенчиков О.А., Габитов М.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Поступила 22.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Beda E.E.¹, Gabitov M.V.², Grebenchikov O.A.¹

The effect of xenon in various concentrations on the volume of brain damage and the severity of neurological disorders in a rat model of open traumatic brain injury

¹Negovsky Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka St., Bldg. 2, Moscow, 107031, Russian Federation;

²Main Production and Commercial Directorate for Servicing the Diplomatic Corps at the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation,
Medincenter Branch,

4 Fourth Dobryninsky Pereulok, Moscow, 119049, Russian Federation

Introduction. Traumatic brain injury (TBI) is a major source of morbidity and mortality worldwide. In Russia every year, more than 100 thousand people lose their ability to work and become disabled as a result of TBI. The aim of this study was to evaluate the effect of xenon at concentrations of 0.25 and 0.5 MAC on the volume of brain damage and the severity of neurological disorders in a rat model of open TBI.

Methods. Experiments were carried out on male Wistar rats divided into four groups: 1) sham-operated group; 2) control group; 3) experimental group of TBI+iXe70% inhalation; and 4) experimental group of TBI+iXe35% inhalation. Neurological status and volume of brain damage were assessed.

Results. The volume of brain damage in the control group was 58.5 mm³. The volume of damage in groups 2 and 3 was 60.5 mm³ and 36.9 mm³, respectively. Inhalation of xenon 70 vol.% for 60 minutes reduced the volume of brain damage by 40% ($p = 0.01$). The volume of brain damage in sham-operated rats was 21.5 mm³, which was significantly less than in the control group ($p = 0.005$) and the group of treated animals ($p = 0.04$). The volume of brain damage in groups 2 and 4 was 57.4 mm³ and 40.5 mm³, respectively. Inhalation of xenon 35 vol.% for 60 minutes reduced the volume of brain damage by 30% ($p = 0.03$). The volume of brain damage in sham-operated rats was 21.5 mm³, which is significantly less than in the control group ($p = 0.001$) and the group of treated animals ($p = 0.02$).

Conclusion. The study showed the high effectiveness of xenon therapy after open TBI in rats.

Keywords: xenon; neuroprotective effect; TBI; rats

For citation: Beda E.E., Gabitov M.V., Grebenchikov O.A. The effect of xenon in various concentrations on the volume of brain damage and the severity of neurological disorders in a rat model of open traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 26-36. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.26-36

Author's contribution: The concept and design of the study – Grebenchikov O.A.; collection and processing of material – Beda E.E.; preparation of illustrative material – Beda E.E.; text writing – Beda E.E.; editing – Grebenchikov O.A., Gabitov M.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Mikhail V. Gabitov*, candidate of medical sciences, Sciences, "Medincenter" under the Ministry of Foreign Affairs of Russia, e-mail: gabitovmv@gmail.com

Information about the authors:

Beda E.E., <https://orcid.org/0009-0008-4637-7598>

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

Gabitov M.V., <https://orcid.org/0009-0005-9615-6118>

Financing. The work was carried out on the research topic "Molecular mechanisms of action of inert gases in severe brain damage and clinical and experimental substantiation of the use of their neurocytoprotective properties in anesthesiology and resuscitation" (No. FGWS - 2022-0002).

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

Received 22.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) — основной источник заболеваемости и смертности во всем мире. При этом главными причинами в целом являются падения и дорожно-транспортные происшествия. Последствия даже незначительной посттравматической церебральной недостаточности могут носить длительный характер и проявляться в виде когнитивных и эмоциональных симптомов,

таких как, головная боль, раздражительность, невнимательность, нарушения сна, тревога и депрессия, приводя в итоге к ухудшению качества жизни. Ежегодно в России более 100 тыс. человек теряют работоспособность и становятся инвалидами в результате ЧМТ [1].

Несомненно, что все цивилизованные страны стремятся к улучшению качества оказания медицинской

помощи и снижению летальности при ЧМТ. Тем не менее, остается существенная потребность в разработке терапевтических средств с нейропротекторными свойствами для защиты нейронов от их вторичного повреждения при патологическом каскаде апоптоза [2].

Патогенез ЧМТ характеризуется наличием первичных и вторичных факторов, приводящих к неврологическому дефициту. Первичный — напрямую связан с внешним воздействием на головной мозг (острая фаза ЧМТ). Вторичная травма наступает отсрочено и состоит из молекулярного, химического и воспалительного каскада, ответственного за дальнейшее повреждение мозга. Этот каскад включает в себя деполяризацию нейронов с высвобождением возбуждающих нейротрансмиттеров, таких как глутамат и аспартат, которые приводят к увеличению внутриклеточного кальция. Последний, активирует ряд механизмов, напрямую зависящих от каспаз, кальпаз и свободных радикалов, приводя к окислительному стрессу и, самое главное, к эксайтотоксичности.

Эксайтотоксичность — это сложный процесс, вызванный активацией рецептора глутамата и приводящий к критическим нарушениям в цитозоле, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и ядре, в конечном счёте приводя к гибели клеточной структуры. Установлено, что реализация механизмов нейропротекции может происходить за счет процесса фосфорилирования фермента гликогенсинтазы-киназы 3β (GSK- 3β), играющего ключевую роль в апоптозе. Сегодня известны несколько препаратов, позволяющие блокировать данный фермент: севофлуран, изофлуран, даларгин и седалит [3–5].

Таким образом, можно предположить, что вторичные процессы, приводящие к дегенерации нейронов, усугубляют церебральную недостаточность, но при этом открывают перспективное окно для поиска новых нейропротекторных препаратов.

Ксенон (химический символ — Xe, от лат. Xenon) — инертный газ, являющийся потенциально новым средством лечения приобретенных ЧМТ. Первым экспериментальным исследованием, в котором было показано влияние ксенона на фосфорилирование GSK- 3β в головном мозге крыс было выполнено А.Н. Кузовлевым и соавт. в 2020 г. Авторы пришли к выводу, что одним из возможных молекулярных механизмов нейропротекторного действия ксенона является фосфорилирование GSK- 3β , препятствующее открытию гигантской митохондриальной поры, торможению митохондрий-опосредованного апоптоза нейронов и увеличению антиоксидантной защиты.

Зарубежные исследования на мышах показали, что применение ксенона после ЧМТ значительно умень-

шает вторичные повреждения нейронов, улучшает краткосрочную вестибулярную функцию и предотвращает когнитивные нарушения. Долгосрочные нейропротекторные эффекты ксенона были связаны со значительным снижением нейровоспаления в нескольких областях мозга, участвующих в ассоциативной памяти. По мнению авторов, можно утверждать о нейропротекторном эффекте ксенона, который сохранялся через 20 мес. после ЧМТ [6].

По мнению R. Campos-Pires и соавт., применение ксенона у крыс после тяжелой ЧМТ снижает потерю нейронов в области сенсомоторной коры головного мозга, связанную с опорно-двигательным и сенсорным дефицитом, а также в гиппокампе и ретроспленальной коре, которые отвечают за когнитивные нарушения. При этом отмечено, что эффективность ксенона может быть повышена за счет сочетания его с легкой или умеренной гипотермией [7].

Известно, что биологические функции NMDA-рецепторов (N-метил-D-аспартат) выходят далеко за рамки молекулярных мишеней ксенона. Они играют важную роль в синаптической пластичности и функции памяти. Дисфункция NMDA-рецепторов вызывает неврологические расстройства, такие как эпилепсия, шизофрения и болезнь Паркинсона [8].

Шкала комы Глазго (The Glasgow Coma Scale) — одна из известных прогностических шкал, используемых в анестезиологии-реаниматологии. Критериями диагностики служат три теста: открывание глаз, речевые и двигательные реакции пациента. Мы считаем, что при экспериментальном поиске новых нейропротекторных препаратов необходимо помнить о безопасности пациента. Научных исследований, подразумевающих применение ксенона в субанестетических дозах, которые не угнетают сознание, но при этом сохраняют его нейропротекторные свойства не проводилось.

Цель исследования — оценка эффективности использования ксенона в концентрациях 0,25 и 0,5 МАК на объем поражения головного мозга и выраженность неврологических нарушений у крыс при моделировании открытой ЧМТ и её коррекции.

Методика

Эксперименты были проведены на крысах-самцах линии Wistar весом 250–350 г. ($n = 35$). Накануне эксперимента животные не получали корм, но имели свободный доступ к воде. Протокол исследования был утвержденным Локальным этическим комитетом ФНКЦ РР № 3/23/2 от 11 октября 2023 г.

Эксперименты выполнены согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Феде-

рации», приказа Министерства здравоохранения и социального развития № 708н от 23.08.2010, а также в соответствии с Международным соглашением о гуманном обращении с животными от 24.11.1986, Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes от 22.09.2010, Европейской конвенцией ETS № 123 о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (Страсбург) от 18.03.1986, с приложением от 15.06.2006, Guide for the care and use of laboratory animals, 8th edition (Руководство по уходу и использованию лабораторных животных, 2010 г.), «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения России от 01.04.2016 N199н.

Моделирование открытой черепно-мозговой травмы (ОЧМТ). Под общей анестезией хлоралгидратом 300 мг/кг было выполнено моделирование ЧМТ в соответствии с методом дозированного контузионного повреждения открытого мозга [9]. Кожу на голове крысы выбривали в области операционного поля и обрабатывали антисептиком Хлоргексидин 0,05%. Крысу размещали в стереотаксической раме, голову фиксировали и делали разрез кожи вдоль сагиттального шва. Отверстие высверливали в теменной и лобной кости черепа с помощью фрезы диаметром 5 мм над левым полушарием в области локализации сенсомоторной коры, по стереотаксическим координатам — 2,5 мм латерально от сагиттального шва и 1,5 мм каудально относительно брегмы. Установку для нанесения травмы размещали таким образом, чтобы боёк находился над твердой мозговой оболочкой. Для нанесения травмы на боёк сбрасывали по направляющим груз массой 50 г с высоты 10 см. Кожу ушивали нитью Викрил №4, а область операции обрабатывали 5% раствором бриллиантового зеленого. До выхода животного из наркоза температуру тела поддерживали на уровне $37 \pm 0,5$ °C с помощью электрической грелки. Контроль осуществляли с помощью ректального датчика, соединенного с термореле. Ложнооперированным животным проводили только истончение теменной кости буром без формирования сквозного отверстия и нанесения удара.

Ложнооперированным животным ($n = 5$) проводили трепанацию черепа, с наложением фрезевого отверстия до твердой мозговой оболочки. Среднее время операции составляло 15–20 мин. После её завершения крысы помещались в герметичную камеру, где в контрольной группе подавалась кислородно-воздушная смесь, а в группах исследования — ксенон в концентрации 70 об.% (0,5 МАК) и 35 об.% (0,25 МАК) в течение 60 мин.

Рандомизация животных. Животные были случайным образом разделены на 4 группы в зависимости от объема проводимых вмешательств:

ложнооперированные животные, которым проводили анестезию, подготовительные мероприятия без ОЧМТ и ингаляций (группа ЛО), $n = 5$;

контрольная группа с ОЧМТ + ингаляция N₂ 70%/O₂ 30% или (группа ОЧМТ), $n = 10$;

опытная группа с ОЧМТ + ингаляция Xe 70%/O₂ 30% (группа ОЧМТ+iXe70), $n = 10$;

опытная группа с ОЧМТ + ингаляция Xe 35%/O₂ 30%, азот 35% (группа ОЧМТ+iXe35), $n = 10$.

MPT исследование. Изучение объема поражения головного мозга было выполнено на 14-е сутки после ЧМТ при помощи MPT-исследования животных. Работа выполнялась на томографе с индукцией магнитного поля 7 Тесла и градиентной системой 105 мТл/м (BioSpec 70/30, Bruker, Германия). Животных наркотизировали изофлураном (1,5–2 об.%) и помещали в устройство позиционирования с системой стереотаксиса и терморегуляции.

Использовали стандартный протокол исследования мозга крысы, который включает в себя получение T₂-взвешенных изображений. Для передачи радиочастотного (РЧ) сигнала использовали линейный трансмиттер с внутренним диаметром 72 мм, для детекции РЧ-сигнала — поверхностную приемную катушку для мозга крысы. Использовали следующие импульсные последовательности (ИП): RARE — ИП на основе спинного эха с параметрами: TR = 6000 мс, TE = 63,9 мс, толщина среза 0,8 мм с шагом 0,8 мм, размер матрицы 256 × 384, разрешение 0,164 × 0,164 мм/пиксель. Общее время сканирования одного животного составляло около 25 мин. Степень повреждения головного мозга оценивали с помощью графического анализа MPT изображений с подсчетом объема поврежденного участка головного мозга. Для этого на серии MPT-изображений выделяли слайд с наибольшей площадью поражения головного мозга. С помощью программы ImageJ (National Institutes of Health image software, Bethesda, MD, США) рассчитывалась площадь повреждения в мм². Далее аналогичным образом рассчитывалась площадь повреждения головного мозга еще на четырех слайдах (два краниальные и два каудальные). Объем повреждения головного мозга рассчитывали по следующей формуле: $V = \sum Sn \times d$, где d — толщина одного среза (0,8 мм), $\sum Sn$ — сумма площадей повреждения на пяти слайдах (мм²) [9].

Оценка неврологического статуса. Для оценки неврологического статуса был применен тест «Постановки конечности на опору (ПКО)» выполненном на обо-

рудования ООО «НПК Открытая Наука». Использовали протокол, основанный на методике, описанной Де Риком М. [10] и модифицированный Джолккеном Дж. [11]. Крыс приучали к рукам в течение недели до тестирования. Тест состоял из семи испытаний, оценивающих сенсомоторную интеграцию передних и задних конечностей в ответ на тактильную, проприоцептивную и зрительную стимуляцию.

Каждый тест оценивался следующим образом: крыса выполняла испытание нормально – 2 балла; крыса выполняла испытание с промедлением (>2 с) и/или не полностью – 1 балл; крыса не выполнила испытание – 0 баллов. Баллы суммировались, результаты представлены в виде суммы баллов за тест.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ STATISTICA 10.0 (StatSoft. Inc., США) и GraphPad Prism. Нормальность распределения признака в выборках оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как медиана (интерквартильный интервал). Статистические различия в данных, имеющих хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального, анализировали с использованием U-теста Манна–Уитни с применением поправки Бонферрони для сопоставления трех и более групп, а также критерий Краскела–Уоллиса или U-теста Манна–Уитни для анализа не более 2-х групп. Критерием статистической значимости был уров

Результаты и обсуждение

В тестовых экспериментах модель открытой черепно-мозговой травмы у крыс признана адекватной, согласно данным морфометрического анализа МР-томографических изображений в группах ложнопериоперированных животных (5 крыс) и контрольной (ОЧМТ + кислородно-азотная смесь (30 об.% кислород, 70 об.% азот – 5 крыс) (рис.1). Как видно из таблицы 1, объем повреждения в контрольной группе ОЧМТ составил 58,5 [47,7; 68,8] мм³.

В группе ложнопериоперированных животных (5 крыс), объем повреждения составил 21,5 [18,4–28,3] мм³ ($p = 0,0058$) в сравнении с контрольной группой.

Объем повреждения в группе ОЧМТ и ОЧМТ + iXe70% составил 60,5 [52,5; 69,3] мм³ и 36,9 [31,5; 40,3] мм³, соответственно (табл. 2, рис. 2). Ингаляция ксенона 70 об.% в течение 60 мин на 40% уменьшает объем поражения головного мозга, разница статистически значима ($p = 0,01$). Объем повреждения головного мозга у ложнопериоперированных животных составил 21,5 [18,4–28,3] мм³, что значительно меньше, чем в группе контроля ($p = 0,005$) и группе леченных животных ($p = 0,04$).

Объем повреждения в группе ОЧМТ и ОЧМТ+iXe35% составил 57,4 [50,5; 63,3] мм³ и 40,5 [37,5; 44,0] мм³, соответственно (табл. 3, рис. 3). Ингаляция ксенона 35 об.% в течении 60 мин на 30% уменьшает объем поражения головного мозга, разница статистически значима ($p = 0,03$). Объем повреждения головного мозга у ложнопериоперированных животных составил 21,5 [18,4–28,3] мм³, что значительно меньше, чем в группе контроля ($p = 0,001$) и группе леченных животных ($p = 0,02$) (табл. 3, рис. 3).

По результатам неврологического осмотра у всех животных, которым моделировалась ЧМТ отмечался значимый неврологический дефицит, который в среднем на 3-и сут в группах, которым моделировалась ЧМТ составил 2 [1; 5] в группе ЧМТ и 3 [1; 7] балла в группе ЧМТ+iXe70 ($p = 0,4006$) (табл. 4). В группе ЛО также отмечался небольшой неврологический дефицит в среднем 11 баллов. На 7-е сутки наблюдения в группе ЧМТ + iXe70% отмечается устойчивая положительная динамика, в то время как в группе ЧМТ неврологический дефицит не значительно улучшается, различия между группами значимы ($p = 0,045$), на 14-е же сутки в группе ЧМТ + iXe70 отмечается выраженное восстановление неврологического статуса медиана которого составила 9 [8; 10,5] в группе ЧМТ+iXe70% в сравнение с 6 [3; 7] баллами в группе ЧМТ ($p = 0,003$) и 13 [9; 14] в группе ЛО ($p = 0,0002$).

По результатам неврологического осмотра у всех животных, которым моделировалась ЧМТ отмечался значимый неврологический дефицит, который в среднем на 3-и сутки в группах, которым моделировалась ЧМТ составил 2 [1; 5] в группе ЧМТ и 2 [1; 6] балла в группе ЧМТ+iXe35 ($p = 0,6$) (табл. 5). В группе ЛО также отмечался небольшой неврологический дефицит в среднем 11 баллов. На 7-е сут наблюдения в группе ЧМТ+iXe35 отмечается устойчивая положительная динамика, в то время как в группе ЧМТ неврологический дефицит не значительно улучшается, различия между группами значимы ($p = 0,03$), на 14-е же сутки в группе ЧМТ+iXe70 отмечается выраженное восстановление неврологического статуса медиана которого составила 9 [8; 10,5] в группе ЧМТ+iXe70% в сравнение с 6 [3; 7] баллами в группе ЧМТ ($p = 0,003$) и 13 [9; 14] в группе ЛО ($p = 0,0002$).

Ксенон – благородный газ, убедительно показывающий нейропротекторные свойства при концентрациях 0,25 и 0,5 МАК на модели открытой ЧМТ крыс. Предполагается, что патофизиологические механизмы его действия основаны на нескольких ведущих факторах: фосфорилирование фермента GSK-3 β , вариантный антагонизм к NMDA-рецепторам глутамата, ак-

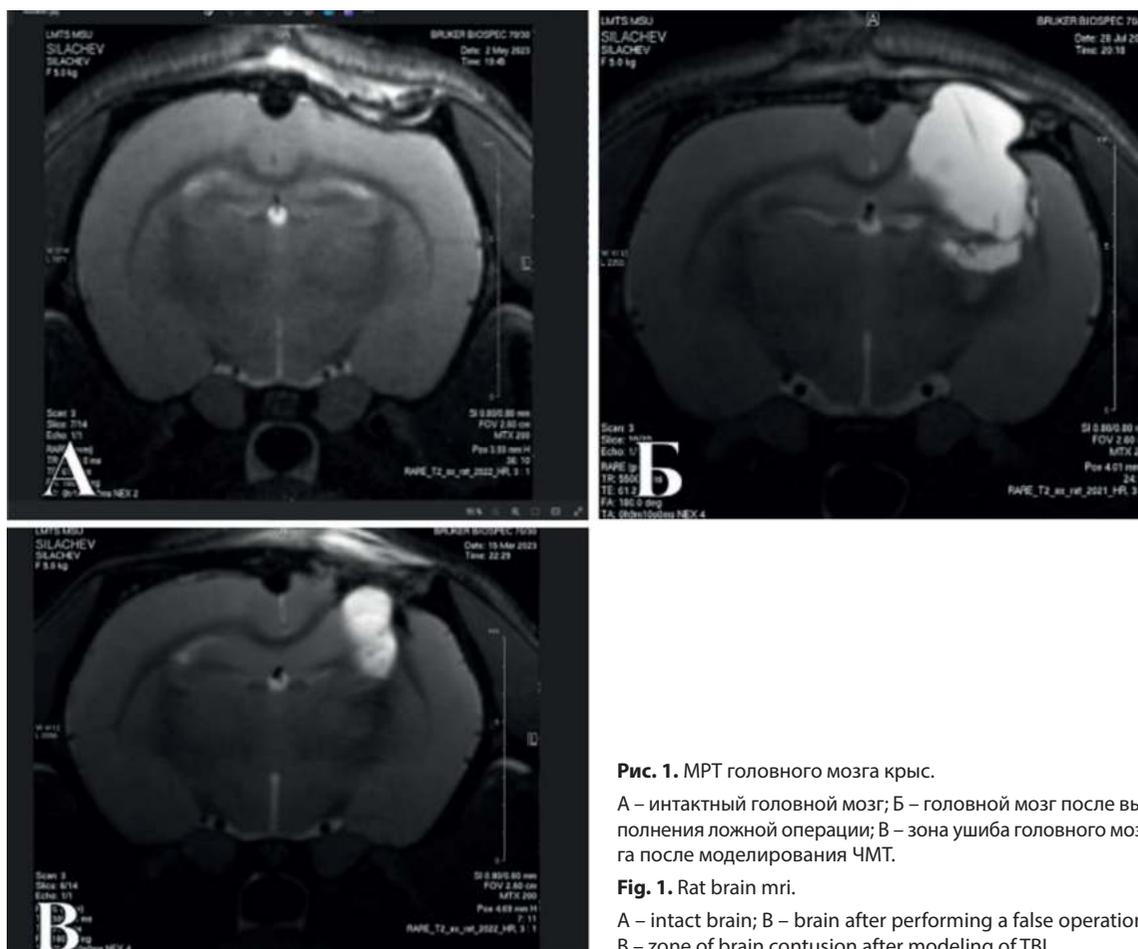


Рис. 1. МРТ головного мозга крыс.

А – интактный головной мозг; Б – головной мозг после выполнения ложной операции; В – зона ушиба головного мозга после моделирования ЧМТ.

Fig. 1. Rat brain mri.

A – intact brain; B – brain after performing a false operation; B – zone of brain contusion after modeling of TBI.

Таблица 1/ Table 1

Объем поражения головного мозга (мм³) по данным морфометрического анализа МР-томографических изображений, объем зоны повреждения на 14-е сут наблюдения

Volume of brain damage (mm³) according to morphometric analysis of MR tomographic images, volume of the damaged area on the 14th day of observation

Группа / Group	Объем повреждения головного мозга мм ³ / Volume of brain damage mm ³	<i>p</i> , значимость относительно ложнооперированных животных и ложнооперированных относительно интактных / <i>p</i> , significance relative to sham-operated animals and sham-operated versus intact animals
Интактные животные (5 крыс) / Intact animals (5 rats)	0	
Ложнооперированные животные (5 крыс) / Sham-operated animals (5 rats)	21,5 [18,4-28,3]	0,000001*
Контрольные животные (ОЧМТ + кислородно-азотная смесь (30 об.% кислород, 70 об.% азот – 5 крыс) / Control animals (open TBI + oxygen-nitrogen mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% nitrogen – 5 rats)	58,5 [47,7; 68,8]	0,0058*

Примечание. Данные представлены в виде медиан [Q1; Q3], * – *p* < 0,05
Note. data are presented as medians [Q1; Q3], * – *p* < 0,05.

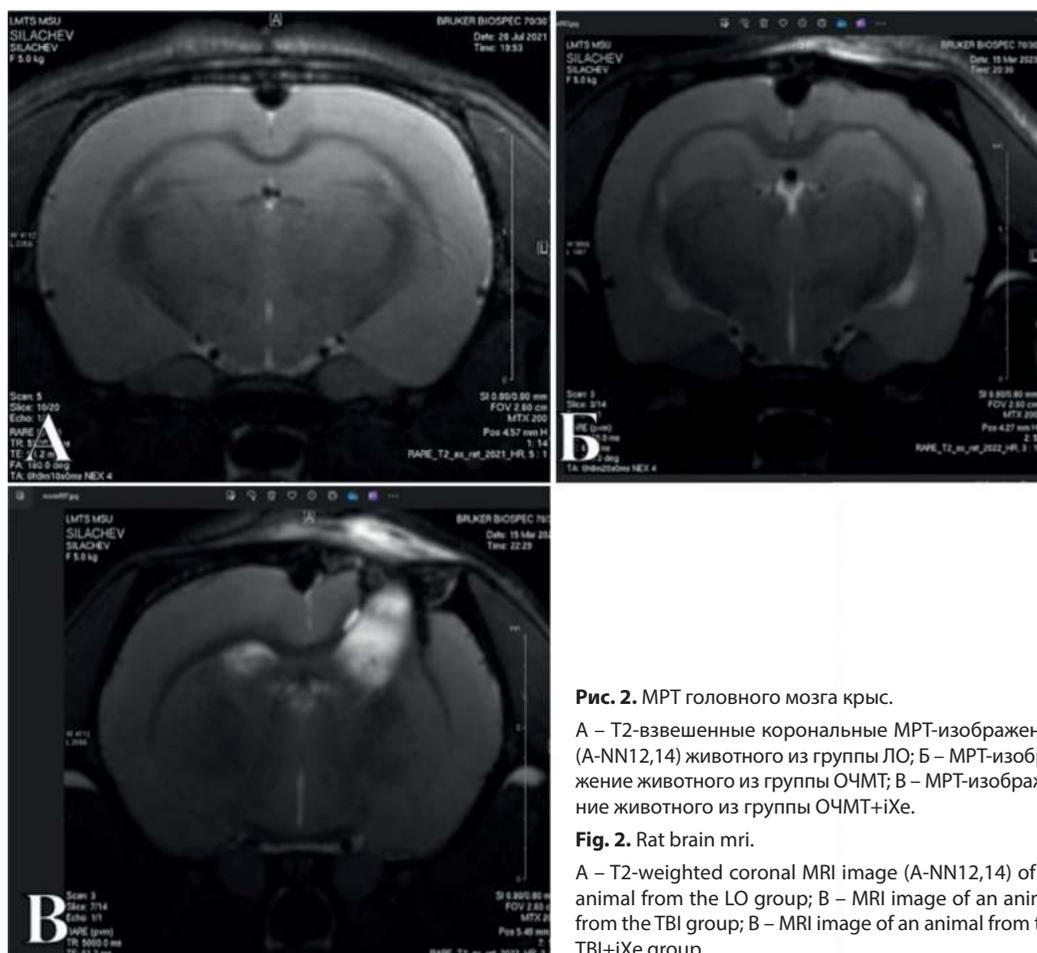


Рис. 2. МРТ головного мозга крыс.

A – T2-взвешенные корональные МРТ-изображение (A-NN12,14) животного из группы ЛО; Б – МРТ-изображение животного из группы ОЧМТ; В – МРТ-изображение животного из группы ОЧМТ+iXe.

Fig. 2. Rat brain mri.

A – T2-weighted coronal MRI image (A-NN12,14) of an animal from the LO group; B – MRI image of an animal from the TBI group; B – MRI image of an animal from the TBI+iXe group.

Таблица 2 / Table 2

Объем поражения головного мозга по данным морфометрического анализа МРТ-томографических изображений, объем зоны повреждения на 14 сут наблюдения. Тест Крускала–Уоллиса с поправкой методом Бенджамини–Кригера–Иекутелли

The volume of brain damage according to morphometric analysis of MRI tomographic images, the volume of the damage zone on the 14th day of observation. Kruskal–Wallis test with Benjamini–Krieger–Iekutelli correction

Группа / Group	Объем повреждения головного мозга мм ³ / Volume of brain damage mm ³	p, значимость относительно контрольной группы и контрольной относительно ложнооперированных животных / p, significance relative to the control group and control versus sham-operated animals
Ложнооперированные животные (5 крыс) / Sham-operated animals (5 rats)	21,5 [18,4-28,3]	0,04*
Контрольные животные (ОЧМТ + кислородно-азотная смесь (30 об.% кислород, 70 об.% азот– 8 крыс) / Control animals (TBI + oxygen-nitrogen mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% nitrogen – 8 rats)	60,5 [52,5; 69,3]	0,005*
Леченные животные (ОЧМТ + кислородно-ксеноновая смесь (30 об.% кислород, 70 об.% ксенон– 10 крыс) / Treated animals (TBI + oxygen-xenon mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% xenon – 10 rats)	36,9 [31,5; 40,3]	0,01

Примечание. Данные представлены в виде медиан [Q1; Q3], * – p < 0,05.
Note. Data are presented as medians [Q1; Q3], * – p < 0.05.

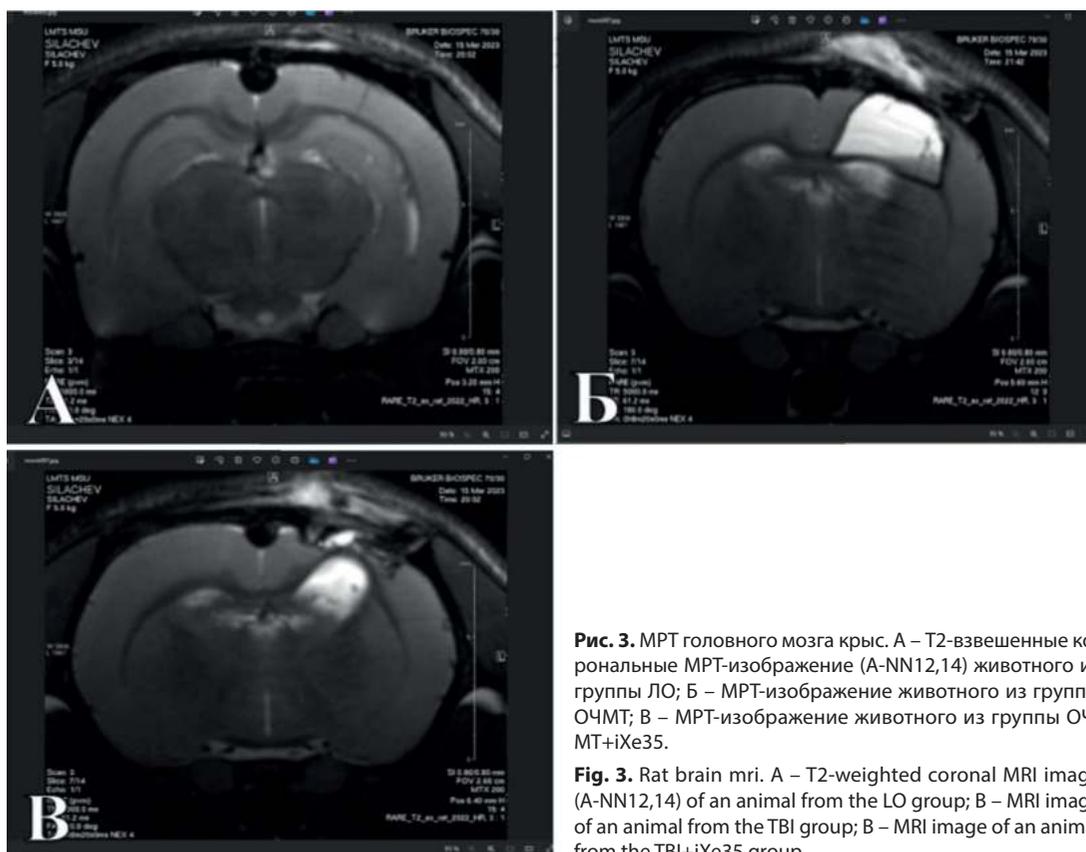


Рис. 3. МРТ головного мозга крыс. А – T2-взвешенные корональные МРТ-изображение (A-NN12,14) животного из группы ЛО; Б – МРТ-изображение животного из группы ОЧМТ; В – МРТ-изображение животного из группы ОЧМТ+iXe35.

Fig. 3. Rat brain mri. A – T2-weighted coronal MRI image (A-NN12,14) of an animal from the LO group; B – MRI image of an animal from the TBI group; В – MRI image of an animal from the TBI+iXe35 group.

Таблица 3/ Table 3

Объем поражения головного мозга по данным морфометрического анализа МРТ-томографических изображений, объем зоны повреждения на 14 сут наблюдения. Тест Крускала–Уоллиса с поправкой методом Бенджамини–Кригера–Иекутелли

Volume of brain damage according to morphometric analysis of MRI tomographic images, volume of the damage zone on the 14th day of observation. Kruskal–Wallis test with Benjamini–Krieger–Iekutelli correction

Группа / Group	Объем повреждения головного мозга мм ³ / Volume of brain damage mm ³	<i>p</i> , значимость относительно контрольной группы и контрольной относительно ложнооперированных животных / <i>p</i> , significance relative to the control group and control versus sham-operated animals
Ложнооперированные животные (5 крыс) / Sham-operated animals (5 rats)	21,5 [18,4-28,3]	0,02*
Контрольные животные (ОЧМТ + кислородно-азотная смесь (30 об.% кислород, 70 об.% азот – 8 крыс) / Control animals (TBI + oxygen-nitrogen mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% nitrogen – 8 rats)	57,4 [50,5; 63,3]	0,001*
Леченные животные (ОЧМТ + кислородно-ксеноновая смесь (30 об.% кислород, 35 об.% ксенон, 35 об.% азот – 9 крыс) / Treated animals (TBI + oxygen-xenon mixture (30 vol.% oxygen, 35 vol.% xenon, 35 vol.% nitrogen – 9 rats)	40,5 [37,5; 44,0]	0,03*

Примечание. Данные представлены в виде медиан [Q1; Q3], * – $p < 0,05$.

Note. data are presented as medians [Q1; Q3], * – $p < 0.05$.

тивация калиевых каналов нейрональной мембраны и депрессия нейровоспаления [12–15].

Заключение

Ингаляция ксенона в концентрации 0,25 МАК при экспозиции 60 мин после моделирования открытой

ЧМТ у крыс значимо уменьшает объем поражения головного мозга на 14-е сут посттравматического периода. Данная концентрация уменьшает неврологический дефицит по данным теста «Постановки конечности на опору» на 7- и 14-е сут. Нами показано, что увеличение концентрации ксенона в газовой смеси до 0,5 МАК,

Таблица 4/ Table 4

Неврологический дефицит при 14-дневном наблюдении с применением теста «Постановка конечности на опору (ПКО)», тест Краске-ла-Уоллиса с поправкой методом Бенджамини-Кригера-Иекутелли

Neurological deficit at 14-day follow-up using the Limb Support Test (LST), Kruskal-Wallis test adjusted by the Benjamini-Krieger-Iekutelli method

Сутки наблюдения / 24 hours of observation	Группы / Groups	Неврологический дефицит (баллы) / Neurological deficit (scores)	p, значимость относительно контрольных животных, для контрольных относительно ложнооперированных животных / p, significance relative to control animals, for control relative to sham-operated animals
3 сутки / 3 days	Ложнооперированные животные, n = 5 / Sham-operated animals, n = 5	11 [10,5; 12]	0,013*
	Контрольные животные (ЧМТ + кислород 30%, азот 70%), n = 8	2 [1; 5]	0,0612
	Леченые животные (ЧМТ + кислородно-ксеноновая смесь (30 об.% кислород, 70 об.% ксенон), n = 10 / Control animals (TBI + oxygen 30%, nitrogen 70%), n = 8 Treated animals (TBI + oxygen-xenon mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% xenon), n = 10	3 [1; 7]	0,4006
7 сутки / 7 days	Ложнооперированные животные, n = 5 / Sham-operated animals, n = 5	12 [9, 25; 13;3]	0,01*
	Контрольные животные (ЧМТ + кислород 30%, азот 70%), n = 8 / Control animals (TBI + oxygen 30%, nitrogen 70%), n = 8	4 [2; 5]	0,008*
	Леченые животные (ЧМТ + кислородно-ксеноновая смесь (30 об.% кислород, 70 об.% ксенон), n = 10 / Treated animals (TBI + oxygen-xenon mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% xenon), n = 10	6 [2,5; 8,0]	0,045*
14 сутки / 14 days	Ложнооперированные животные, n = 5 / Sham-operated animals, n = 5	13 [9; 14]	0,0002*
	Контрольные животные (ЧМТ + кислород 30%, азот 70%), n = 8 / Control animals (TBI + oxygen 30%, nitrogen 70%), n = 8	6 [3; 7]	0,020*
	Леченые животные (ЧМТ + кислородно-ксеноновая смесь (30 об.% кислород, 70 об.% ксенон), n = 10 / Treated animals (TBI + oxygen-xenon mixture (30 vol.% oxygen, 70 vol.% xenon), n = 10	9 [8; 10,5]	0,003*

Примечание. Данные представлены в виде медиан [Q1; Q3], * – p < 0,05.

Note. Data are presented as medians [Q1; Q3], * – p < 0.05.

Таблица 5/Table 5

Неврологический дефицит при 14 дневном наблюдении с применением теста «Постановка конечности на опору (ПКО)», тест Краскела–Уоллиса с поправкой методом Бенджамини–Кригера–Иекутелли

Neurological deficit at 14-day follow-up using the Limb-placing test (LPT), Kruskal-Wallis test adjusted by the Benjamini-Krieger-Iekutelli method

Сутки наблюдения / 24 hours of observation	Группы / Groups	Неврологический дефицит (баллы) / Neurological deficit (scores)	<i>p</i> , значимость относительно контрольных животных, для контрольных относительно ложнооперированных животных / <i>p</i> , significance relative to control animals, for control relative to sham-operated animals
3 сутки / 3 days	Ложнооперированные животные, <i>n</i> = 5 / Sham-operated animals, <i>n</i> = 5	11 [10,5; 12]	0,01*
	Контрольные животные (ЧМТ + кислород 30%, азот 70%), <i>n</i> = 8 / Control animals (TBI + oxygen 30%, nitrogen 70%), <i>n</i> = 8	2 [1; 5]	0,0612
	Леченые животные (ЧМТ + 35% ксенон, 30% кислород, 35% азот), <i>n</i> = 9 / Treated animals (TBI + 35% xenon, 30% oxygen, 35% nitrogen), <i>n</i> = 9	2 (1; 6)	0,6
7 сутки / 7 days	Ложнооперированные животные, <i>n</i> = 5 / Sham-operated animals, <i>n</i> = 5	12 [9; 25; 13; 3]	0,0163*
	Контрольные животные (ЧМТ + кислород 30%, азот 70%), <i>n</i> = 8 / Control animals (TBI + oxygen 30%, nitrogen 70%), <i>n</i> = 8	4 [2; 5]	0,0008*
	Леченые животные (ЧМТ + 35% ксенон, 30% кислород, 35% азот), <i>n</i> = 9 / Treated animals (TBI + 35% xenon, 30% oxygen, 35% nitrogen), <i>n</i> = 9	6,5 [4,5; 8,5]	0,03*
14 сутки / 14 days	Ложнооперированные животные, <i>n</i> = 5 / Sham-operated animals, <i>n</i> = 5	13 [9; 14]	0,0002*
	Контрольные животные (ЧМТ + кислород 30%, азот 70%), <i>n</i> = 8 / Control animals (TBI + oxygen 30%, nitrogen 70%), <i>n</i> = 8	6 [3; 7]	0,2090
	Леченые животные (ЧМТ + 35% ксенон, 30% кислород, 35% азот), <i>n</i> = 9 / Treated animals (TBI + 35% xenon, 30% oxygen, 35% nitrogen), <i>n</i> = 9	10 [9; 11]	0,0025*

Примечание. Данные представлены в виде медиан [Q1; Q3], * – *p* < 0,05.

Note. Data are presented as medians [Q1; Q3], * – *p* < 0,05.

не усиливает его нейропротекторные свойства на головной мозг крыс.

Мы предполагаем, что в клинической практике нейропротективный эффект ксенона при ЧМТ может быть полезен в субанестетических концентрациях (0,25–0,5 МАК). Это позволит не только избежать критических инцидентов в отделениях реанимации, в частности угнетения сознания у пациентов с исходно тяжелой церебральной недостаточностью, но и добиться положительного эффекта при минимальных финансовых затратах, учитывая стоимость ксенона.

Таким образом, выполненное исследование свидетельствует о высокой эффективности терапии ксеноном, как при концентрации 0,25 МАК, так и при 0,5 МАК на модели открытой ЧМТ крыс и перспективности ее использования для уменьшения объема поражения головного мозга и коррекции неврологических нарушений. Мы надеемся, что дальнейшее экспериментальное изучение ксенона, как препарата, обладающего характерными нейропротекторными свойствами, позволит улучшить результаты лечения черепно-мозговой травмы в клинической практике.

Литература

(п.п. 2–12; 14 см. References)

1. Пирадов М.А., Черникова Л.А., Супонева Н.А. Пластичность мозга и современные технологии нейрореабилитации. *Вестник Российской академии наук*. 2018; 88(4): 299–312.
13. Кузовлев А.Н., Шпичко А.И., Рыжков И.А., Гребенчиков О.А., и др. Влияние ксенона на фосфорилирование киназы гликогенсинтазы-3 β и антиоксидантные ферменты в мозге крыс. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь*. 2020; 9(4): 564–72. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-5>
15. Рылова А.В., Лубнин А.Ю., Салова Е.М. Динамика ВЧД во время ксенонной анестезии у нейрохирургических больных без внутричерепной гипертензии. *Анестезиол. и реаниматол.* 2010; 2: 36–9.

References

1. Piradov M.A., Chernikova L.A., Suponeva N.A. Brain plasticity and modern technologies of neurorehabilitation. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2018; 88(4): 299–312. (In Russian).
2. Paul S., Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and pre-clinical studies. *Exp Neurol*. 2021; 335: 113518. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113518
3. Ren M., Senatorov V.V., Chen R.W., Chuang D.M. Postsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(10): 6210–5. doi: 10.1073/pnas.0937423100
4. Maas A. Traumatic brain injury: Changing concepts and approaches. *Chin J Traumatol*. 2016; 19(1): 3–6. doi: 10.1016/j.cjtee.2016.01.001
5. Campos-Pires R., Armstrong S., Sebastiani A., Luh C., Gruss M., Radyushkin K., et al. Xenon improves neurologic outcome and reduces secondary injury following trauma in an in vivo model of traumatic brain injury. *Crit Care Med*. 2015; 43(1): 149–58. doi: 10.1097/CCM.0000000000000624
6. Campos-Pires R., Hirnet T., Valeo F., Ong B.E., Radyushkin K., Aldhoun J., et al. Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival

- after traumatic brain injury in mice. *Br. J. Anaesth*. 2019; 123(1): 60–73. doi: 10.1016/j.bja.2019.02.032
7. Campos-Pires R., Onggradito H., Ujvari E., Karimi S., Valeo F., Aldhoun J., et al. Xenon treatment after severe traumatic brain injury improves locomotor outcome, reduces acute neuronal loss and enhances early beneficial neuroinflammation: a randomized, blinded, controlled animal study. *Crit Care*. 2020; 24: 667. doi: 10.1186/s13054-020-03373-9
8. Liu L., Xu Y., Tang P. Mechanistic insights into xenon inhibition of NMDA receptors from MD simulations. *J. Phys. Chem. B*. 2010; 114(27): 9010–6. doi: 10.1021/jp101687j
9. Feeney D.M., Boyeson M.G., Linn R.T., Murray H.M., Dail W.G. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain research*. 1981; 211(1): 67–77. doi: 10.1016/0006-8993(81)90067-6
10. De Ryck M. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*. 1989; 20(10): 1383–90. doi: 10.1161/01.str.20.10.1383. PMID: 2799870
11. Jolkkonen J., Puurunen K., Rantakömi S., Härkönen A., Haapalinna A., Sivenius J. Behavioral effects of the α 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 400: 211–9.
12. Gruss M., Bushell T.J., Bright D.P., et al. Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol*. 2004; 65(2): 443–52. doi: 10.1124/mol.65.2.443. PMID: 14742687
13. Kuzovlev A.N., Shpichko A.I., Ryzhkov I.A., Grebenchikov O.A., et al. Effect of xenon on phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and antioxidant enzymes in the rat brain. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'*. 2020; 9(4): 564–72. (In Russian). <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-5>
14. Silachev D.N., Ryzhkov I.A., Lapin K.N. et al. Effect of Xenon Treatment on Gene Expression in Brain Tissue after Traumatic Brain Injury in Rats. *Brain Sci*. 2021; 11(7): 889. <https://doi.org/10.3390/brainsci11070889>
15. Rylova A.V., Lubnin A.Ju., Salova E.M. Dynamics of ICP during xenon anesthesia in neurosurgical patients without intracranial hypertension. *Anesteziol. i reanimatol.* 2010; 2: 36–9. (In Russian).

Сведения об авторах:

Бедя Евгений Евгеньевич, аспирант каф. анестезиологии-реаниматологии ФНКЦ ПР, e-mail: beda.evgeniy@mail.ru;

Габитов Михаил Валерьевич, канд. мед. наук, «Мединцентр» ГлавУпДК при МИД России, e-mail: gabitovmv@gmail.com;

Гребенчиков Олег Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. органопротекции при критических состояниях ФНКЦ ПР, e-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092.9

Лебедева А.И., Гареев Е.М., Дусалимова А.М., Кадыров Р.З., Мусина Л.А., Галаутдинов М.Ф., Терегулов И.И.

Морфофункциональные изменения нервной ткани коры головного мозга в условиях вынужденной анаэробной физической нагрузки и после акупунктурного введения аллогенного биоматериала (экспериментальное исследование)

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450000, Уфа, Республика Башкортостан, Россия, ул. Ленина, д. 3

Введение. Вынужденная физическая нагрузка часто нарушает слаженность взаимодействий между корой головного мозга и внутренними органами. Аллогенный биоматериал (БМА) применяется в качестве стимулятора регенерации при его местном применении. Механизм фармакупунктурной коррекции патологических изменений посредством БМА в неокортексе изучен недостаточно.

Цель исследования – изучение структуры нервной ткани коры головного мозга в условиях акупунктурного воздействия на биологически активные точки и фармакупунктурной коррекции с БМА.

Методика. Моделью анаэробной физической нагрузки явилось принудительное плавание крыс самцов с грузом 10% от массы тела. После проведения плавательного теста в опытной группе ($n=20$) вводили суспензию БМА акупунктурно, в контрольной ($n=20$) вводили физиологический раствор. Материал для морфофункционального исследования брали через 5 и 21 сут после принудительной анаэробной физической нагрузки.

Результаты. В контрольной группе обнаруживался реактивный глиоз, отек нейропиля, перинуклеарных и периваскулярных пространств, редукция синаптического аппарата, усиление хроматолиза нейроцитов, снижение уровня ингибитора апоптоза Bcl-2⁺ в клетках. В опытной группе наблюдались признаки восстановления архитектоники слоев нервных клеток неокортекса, увеличения численности синапсов, микроглиальных клеток (CD-68⁺), Bcl-2⁺ клеток, снижение количества клеток теней и GFAP⁺ клеток, восстановление нейроваскулярной единицы, обеспечивающей работу гематоэнцефалического барьера.

Заключение. В контрольной группе происходили деструктивные изменения необратимого характера. Акупунктурное воздействие БМА стимулировало нейропротекторные свойства.

Ключевые слова: аллогенный биоматериал; фармакупунктура; нервная ткань коры головного мозга; нейропротекция

Для цитирования: Лебедева А.И., Гареев Е.М., Дусалимова А.М., Кадыров Р.З., Мусина Л.А., Галаутдинов М.Ф., Терегулов И.И. Морфофункциональные изменения нервной ткани коры головного мозга в условиях вынужденной анаэробной физической нагрузки и после акупунктурного введения аллогенного биоматериала (экспериментальное исследование).

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2024; 68(1): 37-47.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.37-47

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Дусалимова А.М., Кадыров Р.З.; сбор и обработка материала – Лебедева А.И., Галаутдинов М.Ф.; подготовка иллюстративного материала – Мусина Л.А., Терегулов И.И.; статистическая обработка материала – Гареев Е.М.; написание текста – Лебедева А.И.; редактирование – Мусина Л.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Лебедева Анна Ивановна, e-mail: Jeol02@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена за счет средств программы стратегического академического лидерства Башкирского государственного медицинского университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.04.2023

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Lebedeva A.I., Gareev E.M., Dusalimova A.M., Kadyrov R.Z., Musina L.A., Galautdinov M.F., Teregulov I.I.

Morphological and functional changes in the nervous tissue of the cerebral cortex in forced anaerobic exercise and after acupuncture injection of allogeneic biomaterial (experimental study)

Bashkir State Medical University, 3 Lenina St., Ufa, 450000, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Introduction. Forced physical activity often disrupts the interactions between the cerebral cortex and internal organs. Allogeneic biomaterial (BMA) is used as a regeneration stimulator when applied topically. The mechanism of pharmacopuncture correction of pathological changes in the neocortex with BMA is not well understood.

Aim. To study the structure of nervous tissue in the cerebral cortex after acupuncture of biologically active points and pharmacopuncture administration of BMA.

Methods. Anaerobic physical activity was modeled by forced swimming of male rats with a load of 10% of body weight. After the swimming test, in the experimental group ($n=20$), a BMA suspension was administered by acupuncture. In the control group ($n=20$), saline was administered. Five and 21 days following the forced anaerobic exercise, tissue was sampled, and morpho-functional studies were performed.

Results. In the control group, reactive gliosis, edema of the neuropil, perinuclear and perivascular spaces, reduction of the synaptic apparatus, increased chromatolysis of neurocytes, and a decrease in the apoptosis inhibitor Bcl-2+ in cells were found. In the experimental group, there were signs of restoration of the architectonics of the layers of neocortical nerve cells, an increase in the number of synapses, microglial cells (CD-68⁺), cell Bcl-2+, a decrease in the number of shadow cells and cell GFAP+, and restoration of the neurovascular unit that ensures the blood-brain barrier functioning.

Conclusion. In the brain of control rats, irreversible destructive changes prevailed. Acupuncture of BMA stimulated neuroprotection.

Keywords: allogeneic biomaterial; pharmacopuncture; nervous tissue of the cerebral cortex; neuroprotection

For citation: Lebedeva A.I., Gareev E.M., Dusalimova A.M., Kadyrov R.Z., Musina L.A., Galautdinov M.F., Teregulov I.I. Morphological and functional changes in the nervous tissue of the cerebral cortex in forced anaerobic exercise and after acupuncture injection of allogeneic biomaterial (experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 37-47. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.37-47

Author's contribution: concept and design of the study – Dusalimova A.M., Kadyrov R.Z.; collection and processing of material – Lebedeva A.I.; Galautdinov M.F.; preparation of illustrative material – Musina L.A., Teregulov I.I.; statistical processing – Gareev E.M.; writing the text – Lebedeva A.I.; editing the text – Musina L.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Anna I. Lebedeva*, Dr. Sci. Biol., Leading Researcher, Project Manager of the Scientific and Morphological Laboratory of the Institute of Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of Russia, e-mail: Jeol02@mail.ru

Information about the authors:

Lebedeva A.I., <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>

Gareev E.M., <https://orcid.org/0000-0002-6561-0892>

Dusalimova A.M., <https://orcid.org/0009-0006-3329-8845>

Kadyrov R.Z., <https://orcid.org/0000-0002-6353-9084>

Musina L.A., <https://orcid.org/0000-0003-1237-9284>

Galautdinov M.F., <https://orcid.org/0000-0003-4284-5696>

Teregulov I.I., <https://orcid.org/0009-0005-0062-3763>

Financing. This work was supported by the Bashkir State Medical University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030).

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

Received 20.04.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Физическая нагрузка, оказываемая на профессиональных спортсменов, часто сопряжена не только с экстремальным физическим, но и с эмоциональным перенапряжением. В большинстве случаев переутомление и перетренированность наслаиваются друг на друга, давая симптомокомплекс нарушений деятельности организма, включая центральную нервную систему (ЦНС). Переутомление нарушает слаженность

взаимодействий между корой головного мозга, ниже лежащими отделами нервной системы и внутренними органами [1].

Интерес многих исследователей обращен к акупунктуре, как к методу, улучшающему работу иммунной системы и увеличивающему резервные возможности организма [2]. Реализуется данный эффект через изменение активности центральных и перифериче-

ских иммунных органов и систем [3]. Нейромедиаторы и нейропептиды, высвобождающиеся из нервных окончаний, могут модулировать секрецию гормонов и функциональную активность клеток [4].

Аллогенный биоматериал применяется в качестве стимулятора регенерации при его локальном введении в различных органах и тканях [5]. Также, появляются данные о его рефлексогенном использовании, т.к. одним из компонентов реакции организма на акупунктуру является её иммуностимулирующее действие [6–8]. Анализ данных литературы показывает отсутствие данных о влиянии аллогенного биоматериала при его акупунктурном применении на структуру нервной ткани коры головного мозга после вынужденной анаэробной физической нагрузки, что явилось целью настоящего исследования.

Методика

В эксперименте использовались половозрелые крысы – самцы Wistar массой 200–250 г 40 животных. Моделью анаэробной физической нагрузки была выбрана методика принудительного плавания крыс до полного утомления с грузом – тест Порсолта или тест отчаяния [9], который представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты [10]. Все манипуляции с животным были проведены в соответствии с этическими принципами, утвержденными этическим комитетом при ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, протокол № 63 от 22.08.2022 г. (Уфа, Россия) и установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Плавательный тест проводился ежедневно в течение 30 сут подряд для всех животных в одно и то же время суток. Вес груза подбирался в соответствии с весом животного и составлял 10% от массы тела [11]. По истечении 30 сут плавания было сформировано 2 группы животных, в каждой группе находилось по 10 крыс. В опытной группе ($n=20$) вводили суспензию БМА акупунктурно, придерживаясь схемы 1. Для этого 1 флакон (10 мг) разводили в 5 мл физиологического раствора и получали 0,2% раствор и вводили по 0,2 мл в каждую точку. Способ введения – подкожно. Таких точек было 16. Суммарный объем введенной суспензии составил 3,2 мл (6,4 мг). Предварительно все биологически активные точки тестировали с помощью аппарата-ручки «Поиск-02» (ООО Магнитон, Россия). После нахождения усиленного сигнала вводили суспензию БМА. В контрольной группе ($n=20$) вводили физиологический раствор в аналогичном количестве по 0,2 мл (рис. 1). Все инъекции проводили од-

нократно. Доза БМА для крысы была выбрана исходя из клинической эффективности в ранее проведенных исследованиях [12].

Через 5 и 21 сут после инъекций из каждой экспериментальной группы было отобрано по 10 особей и проведено: гистологическое исследование нервной ткани заданного локуса префронтальной коры.

Для проведения гистологического исследования из опыта животных выводили путем инсуффляции летальной дозы паров хлороформа. Кусочки ткани фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, обезжовивали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори.

Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первичного антитела применяли: CD 68 в разведении 1:300 (клон ED1), Gfap в разведении 1:300 (клон 2E1), Bcl-2, (Santa Cruz Biotechnology, США). Для окрашивания использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия).

Для электронномикроскопического исследования кусочки тканей того же локуса фиксировали в 2,5%-м растворе глутаральдегида, приготовленного на какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) с дофиксацией в 1%-м растворе OsO₄ на том же буфере. Материал обезжовивали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. С целью выбора необходимого участка для исследования предва-

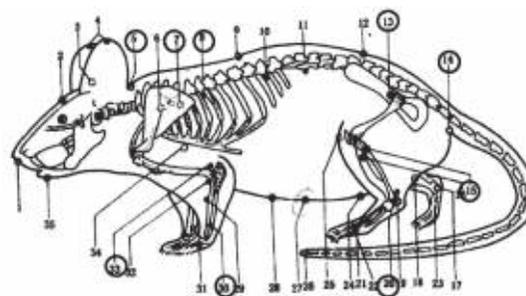


Рис. 1. Биологически активные точки. 5- Да-чжуй, 7 – Синь-шу, 8- Ге-шу, 13- Хуань-тяо, 14- Чан-чян, 15- Ян-лин-цюань, 20- Шэнь-май, 30- Вай-гуань, 33- Чжоу-ляо [13].

Fig. 1. Biologically active points. 5- Da-zhui, 7 – Hsin-shu, 8- Ge-shu, 13- Huan-tiao, 14- Chang-ch'ien, 15- Yang-ling-quan, 20- Shen-may, 30- Wai-guan, 33- Zhou-liao [13].

рительно готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-м растворе безводной соды. Использовали ультратом EM UC 7 (Leica, Германия), трансмиссионный микроскоп JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Подсчет клеток производили в 20-и полях зрения каждого образца ($n=3$). Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием микроскопа Leica DMD 108 (Германия). С целью определения синапсов на ультраструктурном уровне при увеличении $\times 10\,000$ проводили их подсчет на 30-40 полях зрения. Использовали непараметрические методы – ранговый дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллесу для общей оценки изменчивости числа клеток: медиана (Me) и квартили (Q1–25 %; Q3–75 %) и критерий Манна–Уитни для сравнения результатов отдельных сроков наблюдения внутри одной серии опытов или между ними [14]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Использовали статистический пакет программ Statistica 10,0.

Результаты

Через 5 сут после акупунктурного введения физ. раствора в неокортексе прослеживались только I и II слои. III, IV, V и VI четко между собой не дифференцировались (рис. 2, А). Отмечалось снижение количества пирамидальных клеток в III и V слоях коры головного мозга. В клетках наружного зернистого слоя отмечался пикноз ядер и сморщивание нейроцитов, а также периваскулярный и перичеселлюлярный отек. Возле гемокapилляров наблюдалось резкое расширение концевых ножек астроцитов. Сама базальная мембрана была без явных нарушений: гомогенная, плотная, четко очерченная (рис. 2, Б). В нервной ткани выявлялись зоны концентраций глиальных клеток – глиальные рубцы, характеризующиеся скоплениями астроцитов. Выявлялись клетки – тени, активация микроглиоцитов, которые часто контактировали с нейроцитами, среди которых часто определялись гиперхромные клетки (рис. 2, В). Ядра были с изрезанными краями, определялось ядрышко, локализованное эксцентрично.

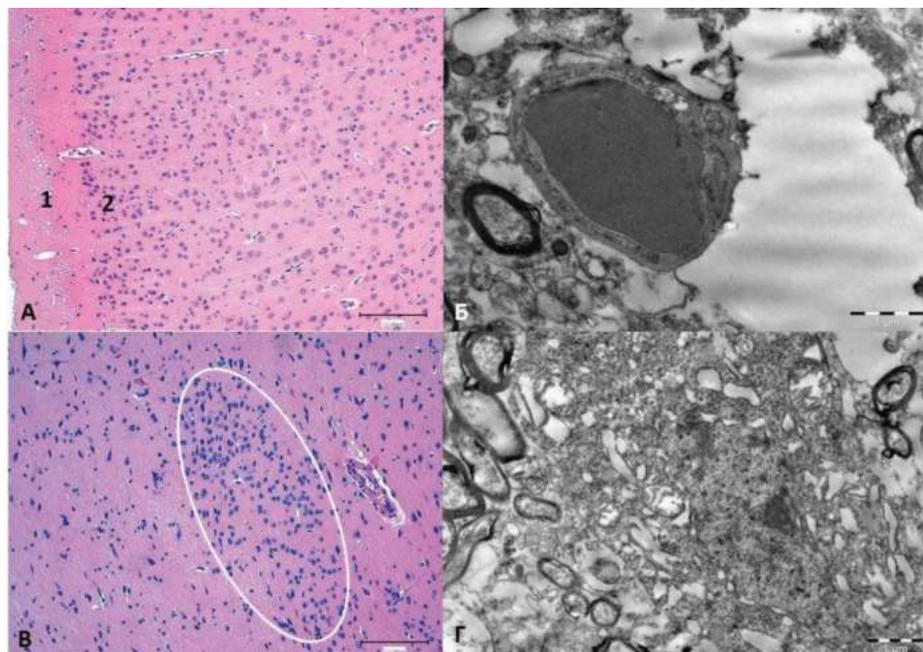


Рис. 2. Структура нервной ткани коры головного мозга предцентральной извилины после вынужденного плавания и акупунктурного введения физ. раствора через 5 сут. А – дезорганизация слоев нервных клеток; 1 – молекулярный слой; 2 – наружный зернистый слой. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$. Б – отек перикапиллярного пространства. Электроннограмма. $\times 8000$. В – глиальные рубцы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$. Г – гиперхромная нервная клетка. $\times 10\,000$. Электроннограмма.

Fig. 2. The structure of the nervous tissue of the cerebral cortex of the precentral gyrus after forced swimming and acupuncture injection of physical solution after 5 days. А – disorganization of layers of nerve cells 1 – molecular layer; 2 – outer granular layer. $\times 200$. Stained with hematoxylin and eosin. В – edema of the pericapillary space. $\times 8000$ Electronogram. С – glial scars Stained with hematoxylin and eosin. $\times 200$ D – hyperchromic nerve cell. $\times 10\,000$. Electronogram.

Хроматин в виде глыбок распределялся в кариоплазме. В цитозоле обнаруживались признаки перенапряжения и деструкции пластинчатых органелл: гипертрофия и вакуолизация комплекса Гольджи, резкое расширение каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), мультивезикулярные тельца, многочисленные везикулы и вакуоли, лизосомы. Митохондрии были округлые, увеличены в размерах, кристы разрушены, митохондриальный матрикс просветлен. Рибосомы в виде полисом определялись мозаично наряду с участками хроматолиза. В нейропиле наблюдались вакуоли, профили миелинизированных нервных волокон были разволокнены (рис. 2, Г).

Спустя 21 сут в нервной ткани коры головного мозга по-прежнему определялись признаки дезорганизации архитектоники слоев нервных клеток. Они характеризовались пикнотически измененными нейронами во внутреннем пирамидальном слое. В гемокapиллярах обнаруживались признаки стаза эритроцитов. Периваскулярные пространства были умеренно расширены. Микроглиоциты находились в тесном контакте с лизированными клетками Беца и возле кровеносных сосудов. Нейропил определялся со сниженной численностью синапсов. Гиперхромные нейроны находились в состоянии декомпенсации. Цистерны комплекса Гольджи были удлиненные, гиперплазированы. Митохондрии набухшие, кристы тотально разрушены, митохондриальный матрикс просветлен. Каналы ГЭР резко расширены. Гладкий эндоплазматический ретикулум гипертрофирован, определялся в виде удлиненных расширенных каналов.

В цитозоле рибосомы распылены, розетки отсутствовали. Выявлялись многочисленные фагосомы, остаточные тельца, липофусциновые включения (рис. 3, А).

Гипохромные нейроны характеризовались просветленной цитоплазмой, в которой определялись полисомы и свободные рибосомы, липофусциновые гранулы, мультивезикулярные тельца. Митохондрии определялись набухшие, с частичным лизисом крист. Короткие каналы ГЭР расширены. Ядра имели изрезанные границы, содержали эухроматин, гетерохроматин конденсировался глыбками (рис. 3, Б).

Через 5 сут после акупунктурного введения БМА в коре головного мозга крыс четко прослеживались все 6 слоев нейроцитов. Все клетки имели типичное строение. Клетки Беца содержали удлиненные отростки, радиально направленные к эпендиму, имели крупную пирамидальную форму (рис. 4, А). Нейропил был плотный, гемокapилляры без особенностей. Гемокapилляры определялись с признаками умеренного периваскулярного отека за счет расширения концевых ножек астроцитов. Базальная мембрана также была с размытыми контурами, набухшая. Миелинизированные оболочки профилей нервных клеток были плотные, осмиофильные (рис. 4, Б).

Выявлялись нормохромные нейроны, имеющие типичную структуру с признаками функциональной активации. В цитоплазме выявлялись полиморфные митохондрии от крупных вытянутых до мелких округлых. Кристы ламеллярные, параллельно ориентированы. Комплекс Гольджи гипертрофирован, развит везикулярный аппарат, каналы ГЭР укорочены, рас-

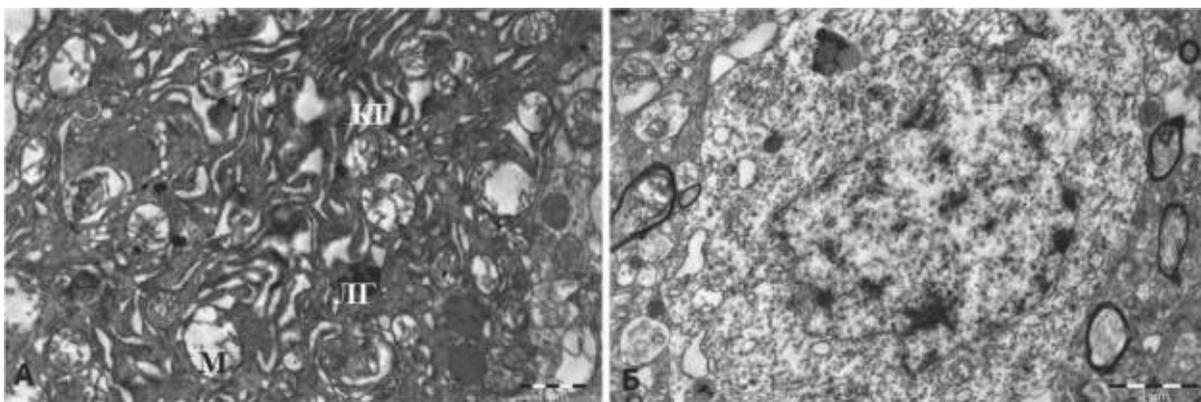


Рис. 3. Нейроны в коре головного мозга предцентральной извилины крысы после вынужденного плавания и акупунктурного введения физ. раствора через 21 сут. А – гиперхромные нейроны в состоянии декомпенсации КГ – комплекс Гольджи, М – митохондрии, ЛГ – липофусциновые гранулы. × 8000. Б – гипохромный пирамидальный нейронит. × 10 000. Электронограммы.

Fig. 3. Neurocytes in the cerebral cortex of the precentral gyrus of the rat after forced swimming and acupuncture administration of physical solution after 21 days. А – hyperchromic neurocytes in a state of decompensation CG – Golgi complex, M – mitochondria, LH – lipofuscin granules. × 8000. В – hypochromic pyramidal neurocyte. × 10 000. Electronograms.

ширены. Цитозоль заполнен полирибосомами, встречались липофусциновые гранулы. Крупное ядро содержало эухроматин и ядрышко (рис. 4, В).

В нейропиле наблюдалось большое количество синапсов, окончания аксонов содержали значительное количество синаптических пузырьков [15] (рис. 4, Г).

Спустя 21 сут определялись все 6 слоев нейроцитов. Крупные пирамидальные клетки Беца имели длинные отростки. Цитоплазма содержала базофильные рибосомальные гранулы. Выявлялись единичные клетки – тени (рис. 5, А). Нейропил плотный. В нем были хорошо выражены многочисленные синапсы с большим количеством четко контурированных синаптических пузырьков. Компактные осмиофильные миелиновые оболочки охватывали аксоны нервных клеток. В ге-

мокапиллярах головного мозга периваскулярное пространство было без особенностей. Выявлялись олигодендроциты в непосредственном плотном контакте с базальной мембраной гемокapилляров. Структура макроглиальных клеток была с признаками морфо-функциональной активации (рис. 5, Б).

При иммуногистохимическом исследовании на пятый день наблюдения в основной и контрольной группах количество GFAP⁺ клеток оказалось незначимо ($Z=0,58, p>0,56$). На 21-е сут в основной группе уровень численности GFAP-клеток, оказался значительно ниже, чем в контрольной группе $Z=4,52 (p<0,0001)$. В основной группе на 5- и 21-е сут наблюдения численность Vcl-2⁺ клеток оказалась значительно выше, чем в контрольной группе ($Z=3,5 \div Z=4,25, p<0,0005 \div$

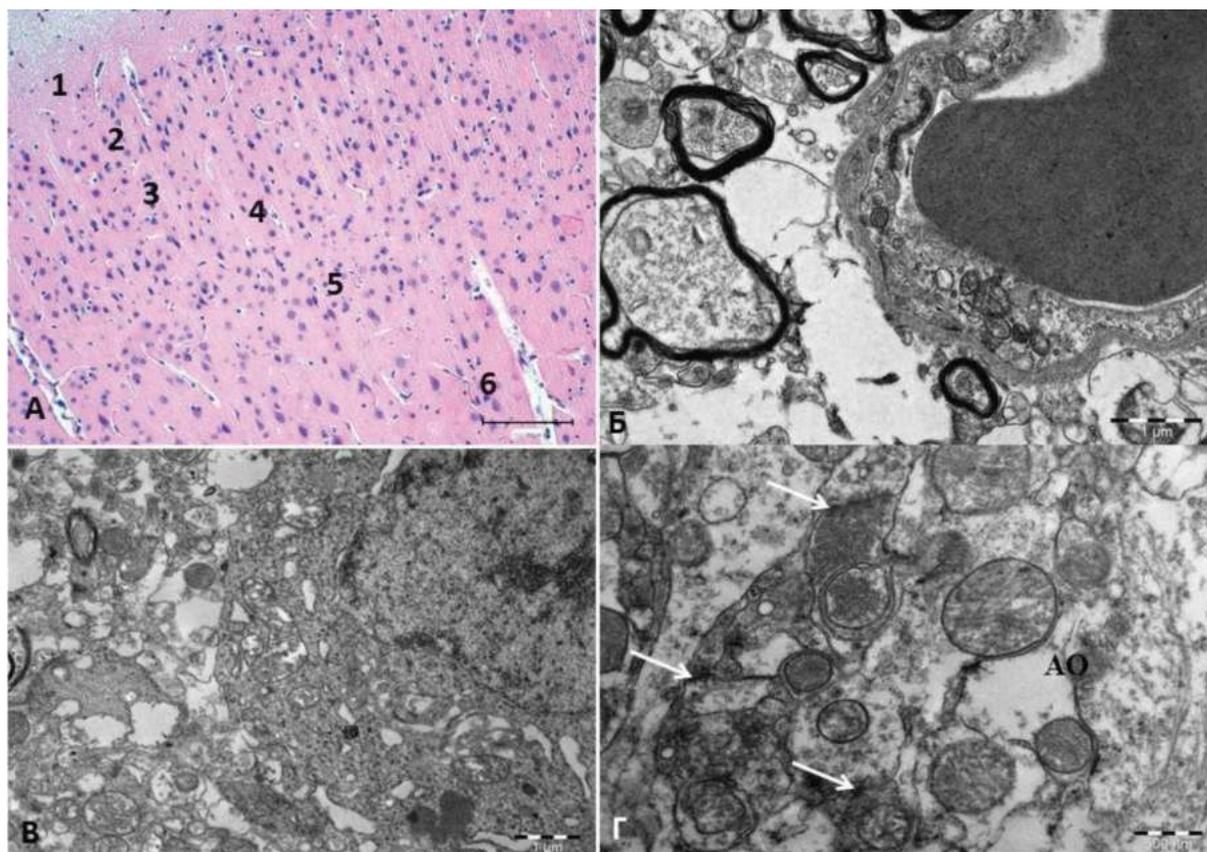


Рис. 4. Строение коры головного мозга предцентральной извилины крысы после вынужденного плавания и акупунктурного введения БМА через 5 сут. А – слои коры: 1 – молекулярный слой; 2 – наружный зернистый слой; 3 – наружный пирамидный слой; 4 – внутренний зернистый слой; 5 – внутренний пирамидный слой; 6) полиморфный слой. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$. Б – умеренный периваскулярный отек. $\times 12\ 000$. В – нормохромный нейроцит. $\times 8000$. Г – синапсы аксонных окончаний (АО), уплотнение синаптической мембраны (\uparrow). $\times 8000$. Электронограмма.

Fig. 4. The structure of the cerebral cortex of the precentral gyrus of a rat after forced swimming and acupuncture administration of BMA after 5 days. А – layers of the cortex: 1 – molecular layer; 2 – outer granular layer; 3 – outer pyramidal layer; 4 – inner granular layer; 5 – inner pyramidal layer; 6 – polymorphic layer. stained with hematoxylin and eosin. $\times 200$. б – moderate perivascular edema. $\times 12\ 000$. с – normochromic neurocyte. $\times 8000$. д – synapses ao – axon ending, (\uparrow) – compaction of the synaptic membrane. $\times 8000$. electronogram.

$p < 0,0001$). На 21-е сут внутригрупповые изменения численности Vcl-2⁺ клеток в основной группе были незначительными ($Z=0,28$, $p > 0,79$). На пятый день в основной группе численность CD-68⁺ клеток оказалась значимо ($p < 0,004$ и менее) выше, чем в контрольной группе, на 21-й день в основной группе численность CD-68⁺ клеток значимо возросла ($Z=5$, $p < 0,0001$), а в контрольной группе существенных и значимых изменений не произошло, следовательно, превышение численности CD 68 клеток основной группы над контрольной стало еще более контрастным и значимым ($Z=5,49 \div Z=5,83$, $p < 0,0001$).

Численность клеток-теней в основной и контрольной группах на пятый день значимо не различалась ($Z=0,6$, $p > 0,54$). Через 21 сут численность клеток-теней в основной группе существенно и значимо снизилась ($Z=5,4$; $p < 0,0001$) и оказалась кратно и значимо

($Z=5,56 \div Z=5,68$, $p < 0,0001$) ниже, чем в контрольной группе. Количество синапсов в нейропиле в основных группах как через 5, так и через 21 сут было достоверно выше, чем в контрольных группах ($Z=5,51 \div Z=5,73$, $p < 0,001$). Причем, со временем численность синапсов в полях зрения в контрольных группах снижалась на два порядка ($Z=5,3$; $p < 0,02$) (см. табл.).

Обсуждение

Природой аллогенного биоматериала служит волокнистая соединительная ткань, лишенная клеточных элементов и состоящая преимущественно из зрелых коллагеновых волокон I типа и связанных с ним протеогликанов, гликопротеинов, гликозаминогликанов: гиалуроновой кислоты, гепаран-, дерматан- и кератансульфата. Их дозированная экстракция, которая в начальные сроки происходит при биодеградации транс-

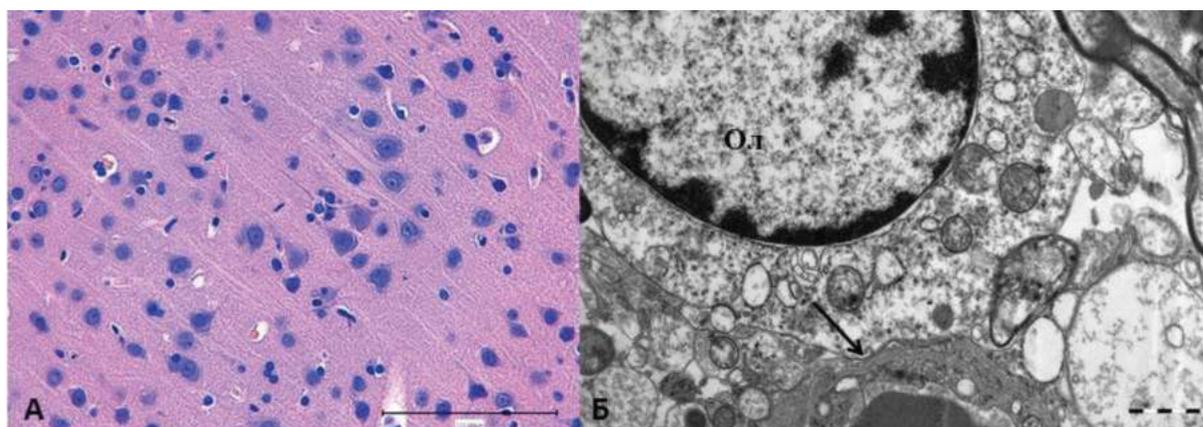


Рис. 5. Нейропил в коре головного мозга предцентральной извилины крысы после вынужденного плавания и акупунктурного введения БМА через 21 сут. А – клетки Беца. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$. Б – олигодендроцит (Ол) в контакте с гемокapилляром. $\times 8000$. Электронограмма.

Fig. 5. Neuropile in the cerebral cortex of the precentral gyrus of a rat after forced swimming and acupuncture administration of BMA after 21 days. А – betz cells. Stained with hematoxylin and eosin. $\times 400$. В – oligodendrocyte (Ol) in contact with the hemocapillary. $\times 8000$. Electronogram.

Уровень численности GFAP⁺, Vcl-2⁺, CD-68⁺ клеток, клеток теней и синапсов на 5-й и 21-й дни наблюдения. (Me= Q1–25%; Q3–75%)

The number of GFAP⁺, Vcl-2⁺, CD-68⁺ cells, shadow cells and synapses on the 5th and 21st days of observation. (Me= Q1–25%; Q3–75%)

Численность клеток Number of cells	GFAP ⁺ GFAP+	Vcl-2 ⁺ Vcl-2+	CD-68 ⁺ CD-68+	клетки тени shadow cells	количество синапсов number of synapses
Основная группа (5-й дней) Main group (5th days)	Me=17 (15; 18)	Me=32 (29; 33)	Me=1,5 (1; 3)	Me=13 (11; 17)	Me=8,2 (5; 15)
Основная группа (21-й день) Main group (21st days)	Me=8 (6; 10)	Me=33 (29; 35)	Me=4 (3; 5)	Me=6 (4; 6)	Me=6,6 (4; 9)
Контрольная группа (5-й день) Control group (5th day)	Me=19 (15; 28)	Me=14,5 (12; 25)	Me=0,5 (0; 2)	Me=14 (12; 14)	Me=6,7 (3; 12)
Контрольная группа (21-й день) Control group (21st day)	Me=16 (14; 17)	Me=4 (4; 5)	Me=1 (0; 2)	Me=13,5 (13; 15)	Me=3,3 (1; 7)

плантата, осуществляется за счет макрофагов. В последующем сами макрофаги начинают секретировать гликозаминогликаны, привлекая фибробласты и регулируя их активность [16, 17]. Для выбора биологически активных точек учитывалось влияние на общее укрепление организма, активизации скелетной мускулатуры конечностей и сердца.

Известно, что выбранный тест принудительного плавания оказывает воздействие на неокортекс, избирательно изменяя морфологию дендритных нейронов и ухудшая их связность, уменьшая количество и объём постсинаптической плотности. В нейронах снижается количество митохондрий, нарушается их целостность, эндоплазматический ретикулум становится менее обильным, редуцируется [18]. Кроме того, подобный длительный стресс вызывает ряд морфологических изменений в клетках микроглии, экспрессирующих CD68, что свидетельствует о функциональной и морфологической активации этой клеточной популяции и рассматривается как развитие воспаления [19]. Гипоксия головного мозга, вызванная анаэробными условиями данного теста, может способствовать гипергидратации нейропиля, разрушению аксональных терминалей, редукции синапсов, реактивному глиозу [20].

В нашем исследовании патоморфологические изменения нервной ткани головного мозга в контрольной группе в ранние сроки характеризовались дезорганизацией слоев нервных клеток в коре, активацией астроглии взамен утраченных нейроцитов. Отмечались признаки отека клеток и периваскулярных пространств, нейропиля. Вакуолизация органелл, декомпенсация и как следствие — хроматолиз, редукция синаптического аппарата накопление липофусциновых гранул — пигмента старения. Данные признаки, включая дезорганизацию клеток, сохранялись на протяжении 21 сут.

Астроциты имеют высокий уровень экспрессии GFAP, который стал одним из наиболее часто используемых для них маркеров. Они способны генерировать распространяющиеся кальциевые сигналы и высвобождать глиотрансмиттеры, обладают функциональной и морфологической пластичностью [21]. Если в начальные сроки численность GFAP⁺ клеток в обеих экспериментальных группах радикально не отличалась друг от друга, то через 21 сут количество астроцитов коррелировало и находилось в прямой зависимости с численностью клеток-теней. Это позволяет судить о компенсаторном разрастании отростков глии и увеличении численности самих перикарионов в связи с утратой нейроцитов, которое нарастало со временем. Роль астроглиоза противоречива. С одной стороны,

известно, что гиперэкспрессия GFAP обнаруживается при большинстве патологических состояний ЦНС, таких как ишемическом и травматическом повреждении мозга, воспалительных процессах, эпилепсии, нейродегенерации. Считается, что ответ астроцитов на действие патологических факторов является неспецифическим и интенсивность экспрессии GFAP зависит от силы и длительности воздействия повреждающих факторов, а не от их природы [22]. С другой стороны, активированные астроциты, образуя подобие защитного вала и формируя глиальный рубец, отграничивают жизнеспособную мозговую ткань от зоны повреждения и препятствуют распространению патологического процесса. Образование астроцитарного рубца, которое наблюдается в контрольной группе, может происходить как за счет миграции клеток к очагу поражения из пролиферативных зон, так и за счет пролиферации имеющихся астроцитов. Известна их токсическая роль на олигодендроциты за счет продуцирования провоспалительных цитокинов (IL-1, IL6, TNF- α), что может способствовать процессам демиелинизации [23]. В данном исследовании наличие глиальных рубцов, скоплений астроцитов коррелирует с разволокнением миелиновых оболочек аксонов в контрольной группе. В организации дренажных систем мозга глиальные клетки принимают непосредственное участие [24]. Периваскулярные отеки за счет расширения концевых ножек астроцитов в контрольной группе свидетельствуют о декомпенсации и истощении резервных возможностей организма, вызванных изнуряющей физической нагрузкой.

Vcl-2 является тормозным регулятором апоптоза в головном мозге после ишемического и травматического повреждения и является промотором выживания нервных клеток [25–27]. В опытной группе в условиях применения БМА количество Vcl-2⁺ клеток в коре головного мозгакратно превышало численность данных клеток контрольной, как в начальные сроки, так и в отдаленный период.

Микроглия является одним из основных морфологических маркеров состояния мозговых формаций при различных патологиях и экспериментальных воздействиях. Также, микроглиальные клетки принимают участие в регуляции процессов образования новых нейронов, изменения их физиологической активности, синаптической пластичности и апоптоза [28, 29]. В условиях применения БМА микроглиальные клетки CD68⁺ несколько превышали их численность в контрольных группах во весь срок наблюдения. Возможно, паттерн изменений согласуется с динамикой местного регионального воздействия в периферических зо-

нах — тканях и органах, где уровень макрофагальной активности превышает значения контрольных групп [30]. Известно, что в области инъекции БМА в субдермальном слое выявляется длительная паравазальная инфильтрация, где доминируют макрофаги. Также определен пролонгированный характер сосудистых реакций, где процессы ангиогенеза в биоматериале коррелируют с динамикой клеточных реакций, резорбцией его волокнистого матрикса. Следовательно, можно судить о пролонгированных морфогенетических процессах в биологически активной точке [6].

Фармакопунктура с применением различных биологически активных веществ — активно используемый метод рефлексотерапии. При активации биологически активных точек клетки инфильтрата (тканевые базофилы, макрофаги, эозинофилы и др.), выделяя комплекс медиаторов боли и воспаления, воздействуют на локальный рецепторный аппарат, включая рецепторы кровеносных сосудов. Затем включается многозвеньевая передача информации при участии нервной, эндокринной и иммунной систем. Очевидно, что данные процессы соподчинены согласно принципу саморегуляции в соответствии с теорией функциональных систем [31]. Описанная динамика клеточных и сосудистых реакций при введении биоматериалов в акупунктурные точки вписывается в современную концепцию фармакотерапии [32].

Заключение

В целом, изменения клеток после изнуряющей физической нагрузки в нервной ткани коры головного мозга на ультраструктурном уровне можно условно разделить на деструктивные, отражающие функциональные нарушения, и адаптационные, направленные на поддержание специфической морфофункциональной активности нервной системы.

Данные морфофункциональные изменения в контрольной группе можно расценивать по совокупности факторов как деструктивные изменения необратимого характера, о чем свидетельствует реактивный глиоз, отек нейропиля, перинуклеарных и периваскулярных пространств, редукция синаптического аппарата, усиление хроматолиза нейроцитов, снижение уровня ингибитора апоптоза Bcl-2⁺ в клетках.

Наши исследования показали, что акупунктурное воздействие с применением аллогенного биоматериала тесно связано с регуляцией нейрогенеза, синаптической пластичностью и выживаемостью нейронов. Нейропротекторные свойства при однократном воздействии БМА выражаются в восстановлении архитектоники слоев нервных клеток неокортекса, увели-

чении численности синапсов, микроглиальных клеток (CD-68⁺), Bcl-2⁺ клеток, снижении количества клеток теней и GFAP⁺ клеток, восстановлении нейроваскулярной единицы, обеспечивающего работу гематоэнцефалического барьера.

Литература

(п.п. 2; 4; 9; 12; 18; 19; 21; 23–27 см. References)

1. Гордон Н.Ф. *Хроническое утомление и двигательная активность*. Киев: Олимпийская литература; 1999.
3. Кроткова О.С. Люминесцентно-морфологическая характеристика селезенки крыс в разные сроки после иголакальвания. *Современные наукоемкие технологии*. 2009; 11: 128-36.
5. Мулдашев Э.Р., Муслимов С.А., Галимова В.У., Нигматуллин Р.Ф., Захваткина К.А., Мусина Л.А. и др. *Биологические основы применения биоматериалов Аллоплант в регенеративной хирургии в кн. Alloplant® Регенеративная медицина*. Под ред. Э.Р. Мулдашева. Уфа: ГУП Государственное республиканское издательство «Башкортостан»; 2014: 30-42.
6. Мулдашев Э.Р., Галимова В.У., Галиахметов Р.Ф., Кирилличев А.И., Апрельев А.Е., Нигматуллин Р.Т. Морфологические аспекты фармакопунктуры с использованием биоматериалов. *Морфологические ведомости*. 2007; 3-4: 128-30.
7. Апрельев А.Е. Эффективность применения фармакопунктуры биоматериалом «Аллоплант» в комплексном лечении пациентов с миопией в отдаленном периоде. *Современная оптометрия*. 2011; 2(42): 12-4.
8. Мирхайдаров Р.Ш. Опыт применения биоматериала аллоплант при хроническом вирусном гепатите на поликлиническом этапе реабилитации. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2021; 98(3-2): 126-7.
10. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: Изд-во ЧГПУ; 2000.
11. Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов. *Биомедицина*. 2011; 1: 72–4.
13. Белоусов П.В. *Акупунктурные точки китайской чжэньцзю-терапии*. Алматы: 2004. ISBN 9965-9452-5-X
14. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. М.: Медиа Сфера; 2002.
15. Питерс А., Палей С., Уэбстер Г. *Ультраструктура нервной системы*. М.: Мир. 1972.
16. Лебедева А.И. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. 2014; 1: 51–6.
17. Шангина О.Р., Хасанов Р.А., Кадыров Р.З., Родионов О.В., Мусина Л.А. Биоматериал для хирургии и способ его получения. *Патент на изобретение 2780831 С1, 04.10.2022*. Заявка № 2021113799 от 17.05.2021

20. Степанов С.С., Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Коржук М.С., Шоронова А.Ю., Авдеев Д.Б. и др. Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсорной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2022; 11(3): 65–74. doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74
22. Горбачёва Л.Р., Помыткин И.А., Сурин А.М., Абрамов Е.А., Пинелис В.Г. Астроциты и их роль в патологии центральной нервной системы. *Российский педиатрический журнал*. 2018; 21(1): 46–53. https://doi.org/10.18821/1560-9561-2018-21-1-46-53
28. Синякин И.А., Баталова Т.А. Микроглия как ключевой компонент регуляции синаптической активности. *Научное обозрение. Биологические науки*. 2020; 4: 53–8. URL: https://science-biology.ru/ru/article/view?id=1215 (дата обращения: 13.02.2023).
29. Алексеева О.С., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2019; 55(4): 231–41.
30. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Роль макрофагов в регенерации мышечных тканей, индуцированных аллогенным биоматериалом. *Российский иммунологический журнал*. 2019; 13(22): 849–51.
31. Судаков К.В. *Общая теория функциональных систем*. М.: Медицина; 1984.
32. Зилов В.Г., Судаков К.В., Эпштейн О.И. *Элементы информационной биологии и медицины*. М.: МГУЛ; 2000.
1. Gordon N.F. *Chronic fatigue and physical activity. [Hronicheskoe utomlenie i dvigatel'naya aktivnost']*. Kiev: Olimpiyskaya literatura 1999. (in Russian)
2. Cabýoglu M.T., Ergene N., Tan U. The mechanism of acupuncture and clinical applications. *International Journal of Neuroscience*. 2006; 116(2): 115–25. doi: 10.1080/00207450500341472
3. Krotkova O.S. Luminescent-morphological characteristics of the spleen of rats in different rats at different time periods after acupuncture. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. 2009; 11: 128–36. (in Russian)
4. Han J.S. Acupuncture and endorphins. *Neuroscience Letters*. 2004; 361(1-3): 258–61. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.019
5. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Galimova V.U., Nigmatullin R.F., Zahvatkina K.A., Musina L.A., et al. *Biological bases for the use of Alloplant biomaterials in regenerative surgery in the book. Alloplant® Regenerative medicine. [Biologicheskie osnovy primeneniya biomaterialov Alloplant v regenerativnoy khirurgii v kn. Alloplant® Regenerativnaya meditsina]*. Ed. E.R. Muldashev. Ufa: GUP Gosudarstvennoe respublikanskoe izdatel'stvo «Bashkortostan» 2014: 30–42. (in Russian)
6. Muldashev E.R., Galimova V.U., Galiakhmetov R.F., Kirillichev A.I., Aprelev A.E., Nigmatullin R.T. Morphological aspects of pharmacopuncture using biomaterials. *Morfologicheskie vedomosti*. 2007; 3-4: 128–30. (in Russian)
7. Aprelev A.E. Efficiency of using pharmacopuncture with Alloplant biomaterial in the complex treatment of patients with myopia in the long-term period. *Sovremennaya optometriya*. 2011; 2(42): 12–4. (in Russian)
8. Mirkhaydarov R.Sh. Experience in the use of alloplant biomaterial in chronic viral hepatitis C at the outpatient stage of rehabilitation. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury*. 2021; 98(3–2): 126–7. (in Russian)
9. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *European Journal of Pharmacology*. 1978; 47(4): 379–91. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8
10. Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.E. *Experimental modeling and laboratory assessment of adaptive reactions of the body. [Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma]*. Chelyabinsk: Izd-vo CHG-PU; 2000. (in Russian)
11. Karkishchenko V.N., Kapanadze G.D., Denginina S.E., Stankova N.V. Development of a methodology for assessing the physical endurance of small laboratory animals to study the adaptogenic activity of certain drugs. *Biomeditsina*. 2011; 1: 72–4. (in Russian)
12. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanas'ev S.A., Kondrat'eva D.S. Experimental cardiomyogenesis under conditions of administration of different doses of the allogeneic biomaterial. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 165(6): 753–6.
13. Belousov P.V. *Acupuncture points of Chinese Zhenjiu therapy. [Akupunkturnye tochki kitayskoy chzhen'c'yu-terapii]*. Almaty: 2004. ISBN 9965-9452-5-X (in Russian)
14. Rebrova O.Yu. *Statistical analysis of medical data. Application of the application package STATISTICA. [Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA]*. Moscow: Media Sfera; 2002. (in Russian)
15. Peters A., Paley S., Webster G. *Ultrastructure of the nervous system. [Ul'trastruktura nervnoy sistemy]*. Moscow: Mir; 1972. (in Russian)
16. Lebedeva A.I. Regulation of parenchymal-stromal relationships in the correction of skeletal muscle defects with allogeneic biomaterial. *Eksperimental'naya i klinicheskaya dermatokosmetologiya*. 2014; 1: 51–6. (in Russian)
17. Shangina O.R., Khasanov R.A., Kadyrov R.Z., Rodionov O.V., Musina L.A. *Biomaterial for surgery and method for its production. [Biomaterial dlya khirurgii i sposob ego polucheniya]*. Patent for invention 2780831 C1, 04.10.2022. Application No. 2021113799 dated 05/17/2021 (in Russian)
18. Xie X., Chen Y., Ma L., Shen Q., Huang L., Zhao B., et al. Major depressive disorder mediates accelerated aging in rats subjected to chronic mild stress. *Behavioural Brain Research*. 2017; 329: 96–103. doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.022
19. Llorens-Martín M., Jurado-Arjona J., Bolós M., Pallas-Bazarra N., Ávila J. Forced swimming sabotages the morphological and synaptic maturation of newborn granule neurons and triggers a unique pro-inflammatory milieu in the hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016; 53: 242–54. doi: 10.1016/j.bbi.2015.12.019
20. Stepanov S.S., Makarieva L.M., Akulinin V.A., Korzhuk M.S., Shoronoova A.Yu., Avdееv D.B., et al. Comparison of immunohistochemical and ultrastructural study of the response of axonal terminals of the sensorimotor cortex of white rats to ligation of the common carotid arteries. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2022; 11(3): 65–74. https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74 (in Russian)
21. Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000) *Neurochemical Research*. 2000; 25(9–10): 1439–51.
22. Gorbacheva L.R., Pomytkin I.A., Surin A.M., Abramov E.A., Pinelis V.G. Astrocytes and their role in the pathology of the central nervous system. *Rossiyskiy peditricheskii zhurnal*. 2018; 21(1): 46–53. https://doi.org/10.18821/1560-9561-2018-21-1-46-53 (in Russian)

References

23. Sofroniew M.V. Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015; 7(2): a020420. doi: 10.1101/cshperspect.a020420
24. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010; 119: 7–35.
25. Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097–9.
26. Cleary M.L., Smith S.D., Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*. 1986; 47: 19–28.
27. Lindsten T., Zong W.X., Thompson C.B. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist*. 2005; 11(1): 10-5. doi: 10.1177/1073858404269267
28. Sinyakin I.A., Batalova T.A. Microglia as a key component in the regulation of synaptic activity. *Nauchnoe obozrenie. Biologicheskie nauki*. 2020; 4: 53-8. (in Russian)
29. Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevsky D.E. Brain microglia: origin, structure and functions. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii*. 2019; 55(4): 231–41. (in Russian)
30. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Afanasiev S.A., Kondratieva D.S. The role of macrophages in the regeneration of muscle tissues induced by allogeneic biomaterial. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2019; 13(22): 849-51. (in Russian)
31. Sudakov K.V. *General theory of functional systems. [Obshchaya teoriya funktsional'nykh sistem]*. Moscow: Meditsina. 1984. (in Russian)
32. Zilov V.G., Sudakov K.V., Epstein O.I. *Elements of information biology and medicine. [Elementy informatsionnoy biologii i meditsiny]*. Moscow: MGUL; 2000. (in Russian)

Сведения об авторах:

Лебедева Анна Ивановна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр., и.о. зав. научно-исследовательским отделом морфологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»;

Гареев Евгений Мусинович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела нейрофизиологии ФГБУ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»;

Дусалимова Айгуль Маратовна, врач-невролог отд-ния восстановительной медицины ФГБУ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»;

Кадыров Радик Завилович, доктор мед. наук, зам. директора по лечебной работе, врач-офтальмолог ФГБУ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»;

Мусина Ляля Ахияровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. научно-исследовательского отдела морфологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»;

Галаутдинов Марс Фларитович, мл. науч. сотр. Института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Терегулов Ильдар Ильшатович, мл. науч. сотр. научно-морфологической лаб. Института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616.155.392:616.71-007.234

Осиков М.В.^{1,2}, Коробкин Е.А.^{1,2}, Димов Г.П.¹

Продукты пероксидации липидов в костной ткани как маркеры остеопении у больных с хроническим лимфолейкозом

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

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

Для хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) характерна с частотой до 67% потеря минеральной плотности костной ткани (МПК), остеопения и остеопороз. Патогенез поражений костей при ХЛЛ не ясен, может быть связан с окислительным стрессом. Цель работы — исследовать взаимосвязи между содержанием продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в костной ткани и показателями остеопении у больных с ХЛЛ.

Исследование проведено на 40 пациентах мужского пола с ХЛЛ в возрасте 50-70 лет. При остеоденситометрии оценивали МПК, T-показатель в поясничном отделе позвоночника (ПОП), шейке проксимального отдела бедренной кости (ШПОБК), проксимальном отделе бедренной кости (ПОБК). В группе 1 (n=30) больные ХЛЛ не имели отклонений МПК, в группе 2 (n=10) были признаки остеопении (T-показатель от -1,0 SD до -2,5 SD). В сыворотке определяли концентрацию общего витамина D, общего и ионизированного кальция, фосфора, тестостерона. В гомогенате костной ткани определяли содержание изопропанол- и гептан- растворимых продуктов ПОЛ. Статистическая обработка проводилась с использованием «IBM SPSS Statistics v. 23». Установлено, что у больных с ХЛЛ в 25% случаев обнаруживаются признаки остеопении в ПОБК на основании показателей остеоденситометрии. Наличие остеопении у больных с ХЛЛ сопровождается гипофосфатемией, снижением концентрации в сыворотке общего витамина D и тестостерона ниже референсных значений, нормальной концентрацией общего и ионизированного кальция. У больных с ХЛЛ и признаками остеопении в костной ткани накапливаются в гептановой фазе липидного экстракта вторичные и конечные продукты, в изопропанольной фазе — конечные продукты окислительной модификации липидов. Признаки остеопении у больных с ХЛЛ нарастают по мере снижения концентрации в сыворотке фосфора, общего витамина D, тестостерона и увеличения содержания в костной ткани вторичных и конечных продуктов окислительной деструкции липидов в гептановой и изопропанольной фазе липидного экстракта.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз; костная ткань; остеопения; окислительный стресс; перекисное окисление липидов

Для цитирования: Осиков М.В., Коробкин Е.А., Димов Г.П. Продукты пероксидации липидов в костной ткани как маркеры остеопении у больных с хроническим лимфолейкозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(1): 48-54.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.48-54

Участие авторов: разработка идеи, концепции и дизайна работы, критическая редакция текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи – Осиков М.В.; проведение экспериментальной части работы, статистическая обработка данных, интерпретация полученных данных, заготовка статьи, редактирование – Коробкин Е.А.; анализ полученных данных, редактирование – Димов Г.П. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Osikov M.V.^{1,2}, Korobkin E.A.^{1,2}, Dimov G.P.¹

Products of lipid peroxidation in bone tissue as markers of osteopenia in patients with chronic lymphocytic leukemia

¹South State Medical University,
64 Vorovsky str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;
²Chelyabinsk Regional Clinical Hospital,
70 Vorovsky St., Chelyabinsk, 454048, Russian Federation

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by loss of bone mineral density (BMD), osteopenia and osteoporosis with a frequency of up to 67%. The pathogenesis of bone lesions in CLL is unclear and may be related to oxidative stress. The purpose of the work is to investigate the relationship between the content of lipid peroxidation products (LPO) in bone tissue and indicators of osteopenia in patients with CLL.

The study was conducted on 40 male patients with CLL aged 50-70 years. Osteodensitometry assessed BMD, T-score, Z-score in the lumbar spine (LS), proximal femoral neck (PFC), and proximal femoral bone (PHB). In group 1 (n=30), patients with CLL had no BMD abnormalities; in group 2 (n=10) there were signs of osteopenia (T-score from – 1.0 SD to – 2.5 SD). The concentration of total vitamin D, total and ionized calcium, phosphorus, and testosterone was determined in the serum. The content of isopropanol- and heptane-soluble lipid peroxidation products was determined in the bone tissue homogenate. Statistical processing was carried out using IBM SPSS Statistics v. 23[®]. It has been established that in patients with CLL, in 25% of cases, signs of osteopenia are detected in the PHB based on osteodensitometry indicators. The presence of osteopenia in patients with CLL is accompanied by hypophosphatemia, a decrease in serum concentrations of total vitamin D and testosterone below reference values, and normal concentrations of total and ionized calcium. In patients with CLL and signs of osteopenia, secondary and end products accumulate in the bone tissue in the heptane phase of the lipid extract, and end products of oxidative modification of lipids accumulate in the isopropanol phase. Signs of osteopenia in patients with CLL increase as the serum concentration of phosphorus, total vitamin D, testosterone decreases and the content in bone tissue of secondary and final products of oxidative destruction of lipids in the heptane and isopropanol phase of the lipid extract increases.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; bone tissue; osteopenia; oxidative stress; lipid peroxidation

For citation: Osikov M.V., Korobkin E.A., Dimov G.P. Products of lipid peroxidation in bone tissue as markers of osteopenia in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 48-54. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.48-54

Author's contribution: development of the idea, concept and design of the work, critical editing of the text of the article, approval of the final version of the article – Osikov M.V.; carrying out the experimental part of the work, statistical data processing, interpretation of the data obtained, preparation of the article, editing – Korobkin E.A.; analysis of the obtained data, editing – Dimov G.P. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Mikhail V. Osikov*, doctor of Medical Sciences, professor, head of the department of pathophysiology South Ural State Medical University, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Information about the authors:

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 22.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) — это опухоль из малых В-лимфоцитов со значительным лимфоцитозом и как правило индолентным течением [1]. Заболеваемость ХЛЛ в европейских странах составляет около 5 случаев на 100 тыс. человек в год и увеличивается с возрастом пациентов; в РФ заболеваемость ХЛЛ достаточно стабильна и составляет около 3 случаев на 100 тыс. Этиология ХЛЛ остается недостаточно

изученной с определенной ролью многочисленных генетических и экологических факторов [2]. В патогенезе ХЛЛ может иметь значение окислительный стресс как один из механизмов, вызывающих активацию различных внутриклеточных сигнальных путей выживания опухолевых клеток [3]. В частности, мутация гена, кодирующего p53, нарушает синтез глутатионпероксидазы и альдегиддегидрогеназы-4, активность сестринов,

глутаминазы-2 и TIGAR, повышает устойчивость опухолевых клеток к продуктам перекисного окисления липидов (ПОЛ) путем подавления SLC7A11 — компонента антипортера цистеин/глутамат, ингибирования поглощения цистеина и синтеза глутатиона, повышая антиоксидантную защиту за счет активации NRF2 [4]. В-клетки при ХЛЛ производят аномально большое количество активных форм кислорода (АФК), стимулируя антиоксидантную активность, что инициирует свободно-радикальное повреждение гемопоэтических клеток в костном мозге, а также клеток микроокружения и костной ткани. ХЛЛ характеризуется развитием ряда осложнений, включая остеодеструктивный синдром, потерю костной массы, остеопению и остеопороз. Риск снижения костной массы у пациентов ХЛЛ составляет 67% для всех возрастных групп, а выявляемость — только 10-15% [5]. В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании патогенеза снижения минеральной плотности костной ткани (МПК), риска переломов и важности определения МПК и T-показателя при остеоденситометрии [6]. Большинство исследователей полагают, что патогенез поражений костей при ХЛЛ не ясен, является частью сложного комплекса событий, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования механизмов развития остеопороза при ХЛЛ для разработки эффективных методов лечения.

Цель работы — исследовать взаимосвязь содержания продуктов перекисного окисления липидов в костной ткани и показателей остеопении у больных с ХЛЛ.

Методика

Исследование проведено на базе ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России и ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» в соответствии с этическими принципами, с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 10.04.2023).

Под наблюдением находились 40 пациентов мужского пола с ХЛЛ в возрасте 50-70 лет, в том числе по классификации Vinet 12 пациентов (30%) со стадией А, 22 пациента (55%) со стадией В, 6 пациентов (15%) со стадией С [1]. Диагноз верифицировали с помощью иммунофенотипирования опухолевого клона лимфоцитов на проточном цитофлуориметре «BD FACSCanto II» («BD Biosciences», США) и экспрессии CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD23⁺, легких

цепей иммуноглобулинов каппа или лямбда. Средняя продолжительность болезни составила 12 месяцев. Остеоденситометрия проведена на денситометре «DEXXUM 3» («OsteoSys Co», Южная Корея) с оценкой МПК, T-показателя, Z-показателя в поясничном отделе позвоночника (ПОП), шейке проксимального отдела бедренной кости (ШПОБК), проксимальном отделе бедренной кости (ПОБК). В зависимости от показателей остеоденситометрии пациентов разделили на две группы: группу 1 (n=30), которые не имели отклонений МПК (T- и Z-показатель > -1,0 SD) и группу 2 (n=10) с признаками остеопении (T- и Z-показатель от -1,0 SD до -2,5 SD). Возраст пациентов в группе 1 (61,0 [59,0; 65,0] лет) и в группе 2 (62,0 [57,0; 66,0] лет) был сопоставим ($p > 0,05$). В сыворотке с помощью тест-систем «Beckman coulter» (США) и «Cloud-Clone Corp.» (Китай) на биохимическом анализаторе «AU-408» («Beckman coulter», США) определяли концентрацию общего витамина D, общего и ионизированного кальция, фосфора, тестостерона. В асептических условиях проведена трепанобиопсия гребня подвздошной кости, полученную костную ткань гомогенизировали 3 мин при температуре 4 °С в соотношении 1:10 с физиологическим раствором. В гомогенате костной ткани определяли содержание изопропанол- и гептан-растворимых продуктов ПОЛ на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО-Спектр», Россия) [7]. Измеряли оптическую плотность продуктов ПОЛ соответствующего контроля при 220 нм (содержание продуктов с изолированными двойными связями), 232 нм, 278 нм, 400 нм. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E232/E220 — относительное содержание диеновых конъюгатов (ДК), E278/E220 — кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) и E400/E220 — оснований Шиффа (ШО). Статистическая обработка проводилась с использованием «IBM SPSS Statistics v. 23» («SPSS: An IBM Company», США). Характеристика выборок представлена в формате Me [Q1; Q3], где Me — медиана, Q1 и Q3 — значения нижнего и верхнего квартилей соответственно. Для оценки распределения непрерывных переменных использован тест Шапиро—Уилка. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критерия Манна—Уитни. Для проверки статистической значимости категориальных переменных использовали точный тест Фишера. Для выявления связи между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Исследование костной ткани различной локализации позволило установить, что в группе больных с ХЛЛ и признаками остеопении последние характеризуются значимым снижением МПК, Т- и Z-показателей в проксимальном отделе бедренной кости, включая шейку бедренной кости, и отсутствием значимых изменений данных показателей в костной ткани позвонков поясничного отдела позвоночника (табл. 1). В соответствии с Национальными критериями, медиана МПК, Т-показателя в области шейки проксимального отдела бедренной кости соответствуют признакам остеопении [1].

На следующем этапе у больных с ХЛЛ проведена оценка факторов, влияющих на метаболизм костной ткани. Установлено, что в группе больных ХЛЛ, имеющих признаки остеопении, в сыворотке снижено содержание общего витамина D на 34% по медиане, содержание фосфора – на 32%, тестостерона – на 37% (табл. 2). При этом содержание в сыворотке общего и ионизированного кальция значимо не изменялось и было сопоставимо у больных с ХЛЛ независимо от наличия признаков остеопении.

Сравнительный анализ показателей метаболизма костной ткани у больных с ХЛЛ в зависимости от референсных значений выявил, что у больных с ХЛЛ без признаков остеопении содержание в сыворотке общего витамина D соответствует норме или недостаточности, а в группе с остеопенией концентрация общего витамина D соответствует значениям недостаточности или дефицита (табл. 3). Содержание в сыворотке фосфора в группе 1 у большинства больных с ХЛЛ в норме, только у 23% соответствует дефициту, в тоже время в группе 2 дефицит наблюдался у 60%. Аналогичные реципрокные отношения зафиксированы в отношении уровня тестостерона в сыворотке: в группе 1 дефицит гормона отмечен у 10%, в группе 2 – у 60% больных с ХЛЛ. Зафиксированы значимые различия между группами 1 и 2 при распределении больных по содержанию в сыворотке общего витамина D относительно референсных значений.

Выраженность окислительного стресса в костной ткани у больных с ХЛЛ оценивали по содержанию продуктов окислительной деструкции липидов – ключевой мишени АФК (табл. 4). Установлено, что наличие остеопении у больных с ХЛЛ приводит в гептановой фазе липидного экстракта костной ткани к статистически

Таблица 1/Table 1

Показатели остеоденситометрии у больных с ХЛЛ (Me [Q₁; Q₃])

Indicators of osteodensitometry in patients with CLL (Me [Q₁; Q₃])

Показатели	Группа 1	Группа 2	Значение p
МПК ПОП, г/см ²	1,337 [1,213; 1,528]	1,241 [1,169; 1,346]	0,131
Т-пок. ПОП, SD	1,000 [-0,100; 2,600]	0,200 [-0,400; 1,000]	0,115
Z-пок. ПОП, SD	1,300 [0,400; 2,900]	0,600 [-0,100; 1,400]	0,130
МПК ШПОБК, г/см ²	1,028 [0,995; 1,048]	0,908 [0,822; 0,930]	0,001
Т-пок. ШПОБК, SD	-0,300 [-0,600; -0,200]	-1,200 [-1,900; -1,100]	0,001
Z- пок. ШПОБК, SD	0,500 [0,300; 1,000]	-0,400 [-1,000; 0]	< 0,001
МПК ПОБК, г/см ²	1,081 [1,029; 1,143]	0,980 [0,872; 1,004]	< 0,001
Т- пок. ПОБК, SD	-0,100 [-0,500; 0,400]	-0,800 [-1,700; -0,700]	< 0,001
Z- пок. ПОБК, SD	0,500 [0,100; 1,100]	-0,200 [-1,100; -0,100]	<0,001

Таблица 2/Table 2

Показатели метаболизма костной ткани при ХЛЛ (Me [Q₁; Q₃])

Indicators of bone tissue metabolism in CLL (Me [Q₁; Q₃])

Показатели	Группа 1	Группа 2	Значение p
Витамин D, нг/мл	28,00 [26,00; 37,00]	18,50 [15,00; 22,00]	< 0,001
Кальций общ., ммоль/л	2,480 [2,390; 2,570]	2,530 [2,320; 2,610]	0,851
Кальций иониз., ммоль/л	1,170 [1,100; 1,210]	1,170 [1,160; 1,230]	0,802
Тестостерон, нг/мл	3,705 [3,330; 5,120]	2,335 [2,280; 2,670]	< 0,001
Фосфор, ммоль/л	1,150 [0,950; 1,210]	0,780 [0,630; 0,920]	<0,001

значимому увеличению содержания кетодиенов и сопряженных триенов (на 5,5% по медиане по сравнению с группой 1) и оснований Шиффа (в 24 раза по медиане). В изопропанольной фазе липидного экстракта значимо увеличивается уровень оснований Шиффа (на 41% по медиане). Отметим, что нами у больных с ХЛЛ и признаками остеопении не обнаружено значимых изменений концентрации диеновых конъюгатов в гептановой и изопропанольной фазе, а также кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта костной ткани.

Кальций и фосфор в составе гидроксиапатита являются основными элементами минерального каркаса костной ткани. При ХЛЛ снижение МПК в результате преобладания процессов остеодеструкции над остеосинтезом сопровождается резорбцией костной ткани и оттоком кальция во внеклеточную жидкость, гиперкальциемией, что может приводить к неоднозначным изменениям концентрации кальция в сыворотке: повышению, снижению или сохранению нормальных значений [8]. Нормальный уровень кальция в сыворот-

ке в условиях остеолита может свидетельствовать о сохранной функции почек в регуляции кальций-фосфорного гомеостаза. Полагаем, что гипофосфатемия при ХЛЛ помимо прочего является результатом перемещения внеклеточного фосфора в интенсивно пролиферирующие злокачественные лимфоидные клетки [9]. Дефицит общего витамина D при ХЛЛ отмечен другими исследователями, напрямую зависит от тяжести клинического течения, уровня лейкоцитов и лактатдегидрогеназы в крови и связан с интенсивностью остеолита, плохим прогнозом, более коротким временем лечения, худшей общей выживаемостью [10, 11]. Наряду с общим витамином D тестостерон также участвует в ремоделировании костной ткани, а его дефицит сопряжен со снижением МПК.

Окислительный стресс при ХЛЛ обусловлен избыточной генерацией АФК и нарушением эффективности антиокислительной защиты. Ключевыми источниками АФК выступают митохондрии с высоким уровнем окислительного фосфорилирования, что связано с дефицитом белка p53 и увеличением син-

Таблица 3/Table 3

Сравнительная характеристика показателей метаболизма костной ткани у больных с ХЛЛ

Comparative characteristics of bone tissue metabolism parameters in patients with CLL

Показатели	Группа 1	Группа 2	Значение p
Витамин D >30 нг/мл (норма)	12 (40%)	0 (0%)	0,001
Витамин D <30 нг/мл (недостаточность)	18 (60%)	7 (70%)	
Витамин D <20 нг/мл (дефицит)	0 (0%)	3 (30%)	
Тестостерон 2,47-6,73 нг/мл (норма)	20 (66,7%)	4 (40%)	0,159
Тестостерон <2,47 нг/мл (недостаточность)	10 (33,3%)	6 (60%)	
Фосфор 0,87-1,45 ммоль/л (норма)	23 (76,6%)	4 (40%)	0,052
Фосфор <0,87 нг/мл (недостаточность)	7 (23,3%)	6 (60%)	

Примечание. Использован точный критерий Фишера (двусторонняя значимость).

Note. Fisher's exact test was used (two-way significance).

Таблица 4/Table 4

Показатели ПОЛ в костной ткани у больных с ХЛЛ (Ме [Q₁; Q₃])

Indicators of lipid peroxidation in bone tissue in patients with CLL (Me [Q₁; Q₃])

Показатели	Группа 1	Группа 2	Значение p
ДК (г), е.и.о.	0,609 [0,602; 0,617]	0,612 [0,608; 0,626]	0,118
КД и СТ (г), е.и.о.	0,073 [0,056; 0,077]	0,077 [0,076; 0,081]	0,008
ШО (г), е.и.о.	0,003 [0,001; 0,007]	0,076 [0,038; 0,078]	<0,001
ДК (и), е.и.о.	0,504 [0,485; 0,526]	0,506 [0,489; 0,507]	0,754
КД и СТ (и), е.и.о.	0,104 [0,097; 0,121]	0,100 [0,095; 0,109]	0,150
ШО (и), е.и.о.	0,061 [0,047; 0,065]	0,086 [0,084; 0,094]	<0,001

Примечание. Содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазе липидного экстракта костной ткани.

Note. Content of lipid peroxidation products in the heptane (g) and isopropanol (i) phase of the lipid extract of bone tissue.

теза гемоксигеназы-1 [12]. Имеет значение снижение активности каталазы [13]. Активация связанных с окислительным стрессом транскрипционных факторов влияет на экспрессию различных генов, в том числе кодирующих факторы роста, компоненты их сигнальных путей, про- и противовоспалительные цитокины, регуляторы клеточного цикла и др., которые поддерживают выживание и пролиферацию опухолевых В-клеток.

Как известно, Т-показатель представляет стандартизированное отклонение МПК по сравнению со средним значением для того возраста, в котором МПК в данном участке скелета достигает максимума, то есть сравнение с нормальной пиковой костной массой. Z-показатель представляет среднее значение МПК для данного возраста и пола, то есть данные больного сравниваются с возрастной нормой. Согласно рекомендациям ВОЗ, у мужчин старше 50 лет для выявления снижения МПК должен использоваться Т-показатель [14]. С учетом данного факта нами проведен корреляционный анализ между Т-показателем костной ткани исследуемой локализации и показателями метаболизма костной ткани в сыворотке, содержанием продуктов ПОЛ в костной ткани (табл. 5). Обнаружено, что в ПОП Т-показатель и МПК имеют слабую обратную связь с содержанием в костной ткани оснований Шиффа в гептановой фазе, МПК – слабую прямую связь с концентрацией тестостерона в сыворотке.

В ШПОБК выявлена по отношению к Т-показателю и МПК прямая слабая связь с концентрацией фосфора и тестостерона в сыворотке, прямая средней силы связь с концентрацией общего витамина D в сыво-

ротке, обратная слабая связь с содержанием в костной ткани кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в гептановой фазе, обратная средней силы связь с содержанием оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта. В ПОБК установлена между Т-показателем, МПК положительная слабая связь и концентрацией фосфора и общего витамина D в сыворотке, положительная средней силы связь с концентрацией тестостерона в сыворотке, отрицательная средней силы связь с содержанием в костной ткани кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в гептановой фазе, отрицательная средней силы связь с содержанием оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта.

Обнаруженные у больных с ХЛЛ взаимосвязи показателей окислительной модификации липидов и признаков остеопении могут быть обусловлены эффектами окислительного стресса на активность остеокластов и остеобластов с последующим снижением МПК и потерей костной ткани [15]. В частности, редокс-зависимый транскрипционный фактор NRF2 действует как отрицательный регулятор клеточной дифференцировки в остеобластах, ингибируя RUNX2-зависимую транскрипционную активность, инициируя остеорезорбцию остеокластами [16]. При окислительном стрессе повышение экспрессии FGF23 в костной ткани приводит к снижению ее минерализации из-за апоптоза остецитов и/или остеобластов, активации митоген активируемых протеинкиназ и NF-κB [17].

Выводы

1. У больных с ХЛЛ в 25% случаев обнаруживаются признаки остеопении в проксимальном отделе бе-

Таблица 5/Table 5

Корреляция между показателями денситометрии и показателями метаболизма, ПОЛ в костной ткани у больных с ХЛЛ и признаками остеопении

Correlation between densitometry indicators and metabolic indicators, lipid peroxidation in bone tissue in patients with CLL and signs of osteopenia

Показатели	Т-пок. ПОП, SD	МПК ПОП, г/см ²	Т-пок. ШПОБК, SD	МПК ШПОБК, г/см ²	Т-пок. ПОБК, SD	МПК ПОБК, г/см ²
Витамин D, нг/мл	$r_s=0,18$	$r_s=0,17$	$r_s=0,57$	$r_s=0,57$	$r_s=0,44$	$r_s=0,45$
Фосфор, ммоль/л	$r_s=0,11$	$r_s=0,12$	$r_s=0,42$	$r_s=0,41$	$r_s=0,37$	$r_s=0,36$
Тестостерон, нг/мл	$r_s=0,33$	$r_s=0,34$	$r_s=0,47$	$r_s=0,45$	$r_s=0,59$	$r_s=0,61$
ДК (г), е.и.о.	$r_s=-0,15$	$r_s=-0,15$	$r_s=-0,18$	$r_s=-0,16$	$r_s=-0,01$	$r_s=-0,02$
КД и СТ (г), е.и.о.	$r_s=0,03$	$r_s=0,04$	$r_s=-0,34$	$r_s=-0,34$	$r_s=-0,39$	$r_s=-0,39$
ШО (г), е.и.о.	$r_s=-0,33$	$r_s=-0,32$	$r_s=-0,33$	$r_s=-0,34$	$r_s=-0,41$	$r_s=-0,44$
ДК (и), е.и.о.	$r_s=-0,05$	$r_s=-0,03$	$r_s=0,28$	$r_s=0,29$	$r_s=0,23$	$r_s=0,22$
КД и СТ (и), е.и.о.	$r_s=-0,24$	$r_s=-0,25$	$r_s=0,24$	$r_s=0,24$	$r_s=0,28$	$r_s=0,28$
ШО (и), е.и.о.	$r_s=-0,24$	$r_s=-0,24$	$r_s=-0,51$	$r_s=-0,52$	$r_s=-0,61$	$r_s=-0,63$

дренной кости, о чем свидетельствуют данные остеоденситометрии.

2. Наличие остеопении у больных с ХЛЛ сопровождается гипофосфатемией, снижением концентрации в сыворотке общего витамина D, тестостерона ниже референсных значений, а концентрация общего и ионизированного кальция не изменена.

3. У больных с ХЛЛ и признаками остеопении в костной ткани накапливаются в гептановой фазе липидного экстракта вторичные и конечные продукты, в изопропанольной фазе – конечные продукты окислительной модификации липидов.

4. Признаки остеопении у больных с ХЛЛ нарастают по мере снижения концентрации в сыворотке общего витамина D и увеличения содержания в костной ткани вторичных и конечных продуктов окислительной деструкции липидов в гептановой и изопропанольной фазе липидного экстракта.

Литература

(п.п. 2-6; 8-12; 14-17 см. References)

1. Никитин Е.А., Бялик Т.Е., Зарицкий А.Ю., Исебер Л., Капланов К.Д., Лопаткина Т.Н., и др. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. *Современная онкология*. 2020; 22(3): 24-44. doi: 10.26442/18151434.2020.3.200385
7. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: ЧелГПУ, 2000.
13. Белая Ж.Е., Белова К.Ю., Бирюкова Е.В., Дедов И.И., Дзеранова Л.К., Драпкина О.М., и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике остеопороза. *Остеопороз и остеопатии*. 2021; 24(2): 4-47. doi.org/10.14341/osteol2930

References

1. Nikitin E.A., Bialik T.E., Zaritsky A.Y., Iseber L., Kaplanov K.D., Lopatkina T.N., et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocyte lymphoma. Clinical recommendations. *Sovremennaya onkologiya*. 2020; 22 (3): 24-44. (In Russian). doi: 10.26442/18151434.2020.3.200385
2. Chennamadhavuni A., Lyengar V., Mukkamalla S.K.R., Shimanovsky A. Leukemia. 2023 Jan 17. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
3. D’Arena G., Seneca E., Migliaccio I., De Feo V., Giudice A., La Rocca F., et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia:

- still a matter of debate. *Leuk Lymphoma*. 2019 Apr; 60(4): 867-75. doi: 10.1080/10428194.2018.1509317
4. Gall Trošelj K., Tomljanović M., Jaganjac M., Matijević Glavan T., Čipak Gašparović A., Milković L., et al. Oxidative Stress and Cancer Heterogeneity Orchestrate NRF2 Roles Relevant for Therapy Response. *Molecules*. 2022; 27(5): 1468. doi: 10.3390/molecules27051468
5. Danielle M. Brander, Kevin C. Oeffinger, Melissa A. Greiner, Michaela Ann Dinan. Prevalence, screening, treatment, and complications of osteoporosis and osteopenia in Medicare patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Journal of Clinical Oncology*. 38, no. 15_suppl. May 25, 2020. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e24050
6. Johnston C.B., Dagar M. Osteoporosis in Older Adults. *Med Clin North Am*. 2020; 104(5): 873-84. doi: 10.1016/j.mcna.2020.06.004
7. Volchegorskij I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Cejlikman V.E. *Experimental modeling and laboratory assessment of adaptive reactions of the body. [Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma]*. Chelyabinsk: ChelGPU, 2000. (In Russian)
8. Walker M.D., Shane E. Hypercalcemia: A Review. *JAMA*. 2022; 328(16): 1624-36. doi: 10.1001/jama.2022.18331
9. Adhikari S., Mamlouk O., Rondon-Berrios H., Workeneh B.T. Hypophosphatemia in cancer patients. *Clin Kidney J*. 2021; 14(11): 2304-15. doi: 10.1093/ckj/sfab078
10. Graklanov V., Popov V. Vitamin D levels in patients with non-Hodgkin lymphoma/diffuse large B-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J Int Med Res*. 2020; 48(7): 300060520943421. doi: 10.1177/0300060520943421
11. Kubeczko M., Nowara E., Spychałowicz W., Wdowiak K., Bednarek A., Karwasiecka D., et al. Efficacy and safety of vitamin D supplementation in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016; 70(0): 534-41. doi: 10.5604/17322693.1202482
12. Sadeghi M., Fathi M., Gholizadeh Navashenaq J., Mohammadi H., Yousefi M., Hojjat-Farsangi M., et al. The prognostic and therapeutic potential of HO-1 in leukemia and MDS. *Cell Commun Signal*. 2023; 21(1): 57. doi: 10.1186/s12964-023-01074-8
13. Maiti G.P., Sinha S., Mahmud H., Boysen J., Mendez M.T., Vesely S.K., et al. SIRT3 overexpression and epigenetic silencing of catalase regulate ROS accumulation in CLL cells activating AXL signaling axis. *Blood Cancer J*. 2021; 11(5): 93. doi: 10.1038/s41408-021-00484-6
14. Belaya Zh.E., Belova K.Yu., Biryukova E.V., Dedov I.I., Dzeranova L.K., Drapkina O.M., et al. Federal clinical guidelines for diagnosis, treatment and prevention of osteoporosis. *Osteoporoz i osteopatii*. 2021; 24(2): 4-47. (In Russian). doi.org/10.14341/osteol2930
15. Marcucci G., Domazetovic V., Nediani C., Ruzzolini J., Favre C., Brandi M.L. Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Osteoporosis: Novel Preventive and Therapeutic Approaches. *Antioxidants (Basel)*. 2023; 12(2): 373. doi: 10.3390/antiox12020373
16. Gao Y., Patil S., Jia J. The Development of Molecular Biology of Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(15): 8182. doi: 10.3390/ijms22158182
17. Vervloet M.G. Shedding Light on the Complex Regulation of FGF23. *Metabolites*. 2022; 12(5): 401. doi: 10.3390/metabo12050401

Сведения об авторах:

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

Коробкин Егор Александрович, ассистент каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, врач-гематолог ГБУЗ ЧОКБ. e-mail: doktore77@yandex.ru;

Димов Георгий Павлович, канд. мед. наук, науч. сотр. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России; зав. отд. забора, заготовки и хранения гемопоэтических клеток и костного мозга клиники ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-006.4

Кузьмина Е.Г.¹, Черкашенко В.Н.², Павлов В.В.¹, Мушкарина Т.Ю.¹, Антонов К.Н.³,
Устинова Е.Е.², Богданенко Е.В.², Сабурин И.Н.²

Анализ структурных особенностей многомерных данных периферической крови при хроническом лимфоцитарном лейкозе и неходжкинской В-лимфоме в сравнении с нормой

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, 249031, Обнинск, Россия, ул. Королева, д. 4;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 52

Актуальность. Разработка современных методов диагностики разных форм лимфопролиферативных заболеваний по-прежнему актуальна. Оценка многомерных взаимосвязей в системе «иммунитет-опухолевый рост» создает возможность дифференцировать эти заболевания по данным крови, не используя для диагностики материал других органов и тканей.

Цель исследования – внедрение методов многомерного анализа состава субпопуляций лимфоцитов и опухолевых клеток в периферической крови для выявления иммуноструктурных особенностей неходжкинских В-клеточных лимфом, НХЛ и хронического лимфолейкоза, ХЛЛ, в сравнении с нормой.

Методика. Анализ данных осуществлялся при помощи искусственной нейронной сети-самоорганизующихся карт Кохонена (SOM (self organized map)). Эта ИНС позволяет выявлять структуру в многомерных данных, осуществляя проецирование многомерных образов в пространство пониженной размерности (2-х или 3-х мерное).

Результаты. Для поиска различий многомерных образов болезни ХЛЛ и НХЛ от нормы нами использованы искусственные нейронные сети (ИНС). Состояние иммунитета и опухолевых клеток сопоставлено по данным периферической крови пациентов с В-клеточной НХЛ (352 пациента) и ХЛЛ (315 пациентов) с данными здоровых людей (184 человека). Были выявлены структуры, отражающие различия состояний «здоровые люди – пациенты НХЛ» и «здоровые люди – больные ХЛЛ». Характер распределений и значения показателей иммунитета и опухолевого роста в многомерном пространстве различают состояния ХЛЛ – норма и НХЛ – норма.

Заключение. Отличия образов НХЛ и ХЛЛ, полученные методами многомерного анализа, создают основу для создания алгоритма диагностики патологий НХЛ и ХЛЛ.

Ключевые слова: периферическая кровь; многомерный анализ; иммунитет; опухолевые В-клетки; НХЛ; ХЛЛ

Для цитирования: Кузьмина Е.Г., Черкашенко В.Н., Павлов В.В., Мушкарина Т.Ю., Антонов К.Н., Устинова Е.Е., Богданенко Е.В., Сабурин И.Н. Анализ структурных особенностей многомерных данных периферической крови при хроническом лимфоцитарном лейкозе и неходжкинской В-лимфоме в сравнении с нормой. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 55-68.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.55-68

Участие авторов: концепция, анализ данных проточной цитофлуорометрии, создание базы клинических и иммунологических данных, статистическая обработка, клинико-иммунологическая интерпретация данных многомерного математического анализа, подготовка рукописи, редактирование текста статьи, общее руководство исследованием – Кузьмина Е.Г.; концепция, применение методов многомерного анализа, подготовка рукописи и иллюстративного материала, редактирование текста статьи – Черкашенко В.Н.; клиническая диагностика заболеваний – Павлов В.В.; иммунофенотипирование – Мушкарина Т.Ю.; применение методов многомерного анализа, подготовка иллюстративного материала – Антонов К.Н.; применение методов многомерного анализа, подготовка иллюстративного материала – Устинова Е.Е.; работа с литературой – Богданенко Е.В.; концепция, подготовка и редактирование рукописи, общее руководство исследованием – Сабурин И.Н.; окончательное одобрение рукописи – все авторы.

Для корреспонденции: Кузьмина Евгения Геннадьевна, e-mail: kuzmina_e_g@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Kuzmina E.G.¹, Cherkashenco V.N.², Pavlov V.V.¹, Mushkarina T.U.¹,
Antonov K.N.³, Ustinova E.E.², Bogdanenko E.V.², Saburina I.N.²

Analysis of structural features of multidimensional data for peripheral blood in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin B-lymphoma compared with the norm

¹Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of the National Medical Research Radiological Center the Ministry of Health of the Russian Federation,

4 Koroleva Str., Obninsk, 249031, Russian Federation;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University,
1 bld. 52 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

Background. Development of modern methods for diagnosis of various forms of lymphoproliferative diseases is still relevant. Evaluation of multidimensional relationships in the immunity-tumor growth system creates an opportunity to differentiate these diseases based on blood tests, without using materials from other organs and tissues for diagnosis.

Aim. To introduce methods of the multidimensional analysis of the composition of lymphocyte and tumor cell subpopulations in peripheral blood to identify the immuno-structural features of non-Hodgkin B-cell lymphomas (NHL), and chronic lymphocytic leukemia (CLL) by comparison with the norm.

Methods. Data analysis was carried out using an artificial neural network – self-organizing Kohonen maps (SOM (self organized map)). This ANN allows one to reveal the structure in multidimensional data by projecting multidimensional images into a reduced-dimensional space (2- or 3-dimensional).

Results. To detect the differences in multidimensional images of CLL and NHL from the norm, artificial neural networks were used. The state of immunity and tumor cells was compared in patients with B-cell NHL (352 patients) and CLL (315 patients) and in healthy people (184 people) based on data for the peripheral blood. The structures reflecting the differences between «healthy people – NHL patients» and «healthy people – CLL patients» were identified. The nature of distributions and the values of immunity and tumor growth indicators in a multidimensional space distinguish between CLL – normal state and NHL – normal state.

Conclusion. The differences between NHL and CLL images detected by the multivariate analysis provide a basis for creating an algorithm for automated diagnosis of NHL and CLL.

Keywords: peripheral blood; multivariate analysis; immunity; tumor B-cells; CLL; NHL

For citation: Kuzmina E.G., Cherkashenco V.N., Pavlov V.V., Mushkarina T.U., Antonov K.N., Ustinova E.E., Bogdanenko E.V., Saburina I.N. Analysis of structural features multidimensional data of peripheral blood in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's B-lymphoma compared with the norm. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 55-68. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.55-68

Author's contribution: concept, analysis of flow cytometry data, creation of a clinical and immunological data base, statistical processing, clinical and immunological interpretation of multivariate mathematical analysis data, preparation of the manuscript, editing the text of the article, general supervision of the study – Kuzmina E.G.; concept, application of multivariate analysis methods, preparation of the manuscript and illustrative material, editing the text – Cherkashenko V.N.; clinical diagnosis of diseases – Pavlov V.V.; immunophenotyping – Mushkarina T.Yu.; application of multidimensional analysis methods, preparation of illustrative material – Antonov K.N.; application of multidimensional analysis methods, preparation of illustrative material – Ustinova E.E.; work with literature – Bogdanenko E.V.; concept, preparation and editing of the manuscript, general supervision of the study – Saburina I.N.

For correspondence: Kuzmina Yevgeniya Genad'evna, e-mail: kuzmina_e_g@mail.ru

Information about the authors:

Kuzmina E.G., <https://orcid.org/0000-0002-0728-593X>

Cherkashenko V.N., <https://orcid.org/0009-0009-0071-471X>

Mushkarina T.U., <https://orcid.org/0000-0002-1266-1792>

Antonov K.N., <https://orcid.org/0009-0009-0091-3591>

Ustinova E.E., <https://orcid.org/0009-0008-8976-0212>

Saburina I.N., <https://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

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

Funding. The study had no sponsorship

Received 14.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

В наши дни методами молекулярной диагностики устанавливается гистогенез, стадия дифференцировки и иммунофенотип опухолевых клеток, свойственный злокачественной зрелоклеточной лимфопротиферации — хроническому лимфоцитарному лейкозу, ХЛЛ, и неходжкинским В-клеточным лимфомам, НХЛ. Выявлены сотни маркеров, отражающих особенности этих заболеваний [1], их число продолжает возрастать. В силу этого параметры болезни многочисленны, что затрудняет выстраивание индивидуально-го диагноза и прогноза.

В охране генетического гомеостаза организма, иммунная система использует механизмы, в которых участвует многокомпонентный состав ее клеток и их продукты. Описаны дисфункции иммунитета, генетические особенности и иммунофенотипы опухолевых В-клеток при зрелоклеточной лимфопротиферации [1-7]. Степень нарушения иммунокомпетентности в сочетании с присутствием в крови опухолевых клеток представляют собой комплексный образ (многомерный паттерн), отражающий динамическое взаимодействие в системе «иммунитет — опухоль». Этот многомерный образ, как правило, отражает определенные изменения состава и численности клеток периферической крови. Логично предположить, что разные патологии крови формируют уникальные паттерны признаков зрелоклеточной лимфопротиферации (НХЛ и ХЛЛ).

Полагаем, что на современном этапе развития науки, для диагностики злокачественной лимфопротиферации необходима не только характеристика ее морфогенетических и других молекулярных признаков, но и сопоставление их размерности с качеством противоопухолевого иммунитета.

Нами разработан алгоритм и выполнена серия системных исследований по сопоставлению состояния иммунитета и признаков опухолевого роста по данным периферической крови при НХЛ и ХЛЛ. На первом этапе предусмотрен многомерный сравнительный анализ данных пациентов (ХЛЛ и НХЛ) с контрольной группой практически здоровых людей. Необходимо отметить, что при анализе имеющихся публикаций нами не найдено исследований, анализирующих многомерный образ НХЛ и ХЛЛ, полученный на основе данных иммунного статуса и опухолевого роста по данным периферической крови.

Цель исследования — методами многомерного анализа структурировать данные состояния иммунной системы и опухолевых В-клеток в периферической крови пациентов с НХЛ и ХЛЛ; выявить отличия патоло-

гических структур от нормы и оценить перспективы их использования для построения алгоритма автоматизированной диагностики НХЛ и ХЛЛ. Для достижения данной цели были решены следующие задачи:

1. Методами искусственных нейронных сетей (ИНС) самоорганизующимся картами Кохонена (СОКК), визуализирован многомерный массив данных, характеризующий состояние иммунитета и опухолевых В-клеток в периферической крови пациентов с ХЛЛ, НХЛ и здоровых людей.

2. На основе визуализации данных выявлены кластеры и описаны структуры, многомерные образы состояния «иммунитет-опухоль», для двух патологий НХЛ и ХЛЛ по сравнению с группой здоровых людей.

3. В многомерных структурах определены показатели, контрастирующие данные в группах сравнения «ХЛЛ — норма» и «НХЛ — норма», которые можно использовать для построения алгоритма различения нормы от заболеваний.

Методика

Объекты исследования. Проведено клиничко-иммунологическое обследование 352 пациентов с В-клеточными НХЛ и 315 пациентов с ХЛЛ. Другие сведения о больных не приведены, т.к. они не будут использоваться для обсуждения результатов. Группу контроля составили данные 184 практически здоровых людей, преимущественно доноров крови; на момент взятия крови у которых не было отклонений в состоянии здоровья. Средний возраст пациентов составил при НХЛ — 60 лет, ХЛЛ — 62 года, практически здоровых людей 58 лет. Обследование больных и сбор контрольного материала проведены в 1996—2019 гг.

Для дифференциальной диагностики ХЛЛ и НХЛ использованы критерии классификации ВОЗ опухолей лимфоидной и кроветворной системы: объективный анализ ультразвукового, магнитно-резонансного обследования пациентов, иммуногистохимического исследования материала лимфатических узлов, тканей и костного мозга, иммунофенотипирования опухолевых клеток крови и костного мозга [4, 8-11].

Оценка состояния иммунитета и опухолевых клеток. По гемограмме (гематологический анализатор UniCel DxH 800) подсчитывали количество лейкоцитов, относительное и абсолютное число лимфоцитов. Состав ядросодержащих клеток оценивали в цельной крови после предварительного лизиса эритроцитов лизирующим раствором фирмы BD Biosciences. Далее в лимфоцитарном гейте определяли фенотипы субпопуляций иммунокомпетентных клеток и опухолевых В-лимфоцитов методами 2-6-цветной проточной ци-

тометрии на приборе FACSCan или FACSCanto II (BD Biosciences) [4, 8-10].

Для многомерного анализа состояния иммунитета и признаков В-клеточной пролиферации нами для каждого пациента использовано по 13 показателей. Это: количество лейкоцитов, Лц абс, $\times 10^9$ кл/л, процент Лф, общих Т-клеток, $CD3^+CD16^-$; Т-хелперы, $CD3^+CD4^+$; Т-киллеры, $CD3^+CD8^+$; иммунорегуляторный индекс, $CD4/CD8$; процент NK-клеток, $CD16^+CD3^-$; активированных Т-клеток, $CD3^+HLADR^+$; активированных лимфоцитов, $HLADR^+$. Идентификация В-лимфоцитов проведена по маркерам $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$, $CD23^+$.

Методы анализа экспериментальных данных. Визуализация многомерных данных, характеризующих состояние иммунитета и В-клеточной пролиферации, проведена, используя самоорганизующиеся карты (СОКК, Self Organizing Maps, SOM), разработанные Т. Кохоненом (рис. 1) [12-17]. Этим методом многомерные данные **проецируются** в пространство пониженной размерности и **визуализируются** в виде двух(трех)мер-

ной карты. На основе карты возможно осуществление кластеризации за счет выделения в ней векторов (показателей анализируемых признаков) пациентов и здоровых людей с близкими (похожими) характеристиками. Сети Кохонена относятся к классу сетей, обучение которых производится «без учителя», то есть результат обучения зависит только от структуры входных данных.

Сеть Кохонена имеет два слоя: входной и выходной, составленный из нейронов упорядоченной структуры (рис. 1, а). Выходной слой называют также слоем топологической карты, или «экраном». Нейроны выходного слоя располагаются в узлах двумерной сетки с прямоугольными или шестиугольными ячейками (рис. 1, б). Количество нейронов в сетке определяет степень детализации результата работы алгоритма, и зависит от объема данных, в которых выявляют структуру.

Самоорганизующиеся карты, в ходе своего обучения, анализируют характер расположения точек входного слоя в m -мерном пространстве и воспроизводят на выходе нейронной сети топологический порядок

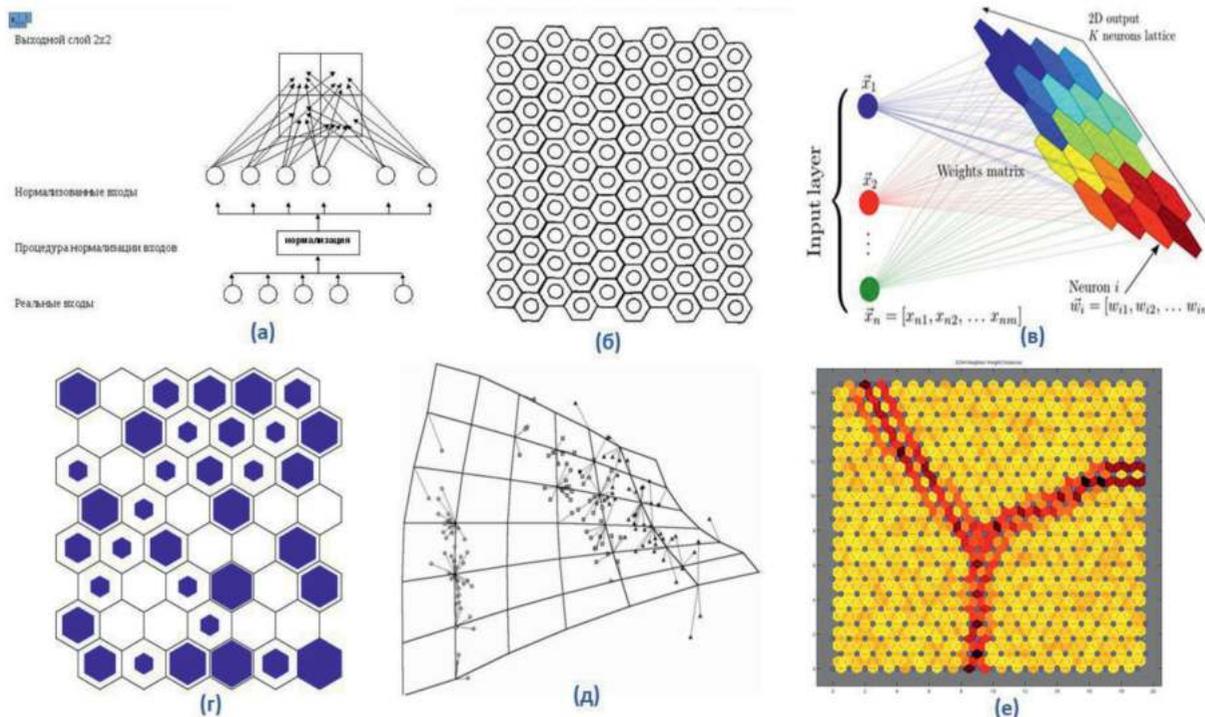


Рис. 1. Иллюстрация алгоритма работы самоорганизующихся сетей СОКК (SOM).

Пояснения алгоритма работы самоорганизующихся сетей Кохонена СОКК (SOM) к рисунку 1 приведены в тексте.

Fig. 1. Illustration of the algorithm of operation of self-organizing SOKK networks (SOM).

Explanations of the algorithm for the operation of self-organizing Kohonen networks SOKK (SOM) to Figure 1 are given in the text.

и определенную степень регулярности исходных данных (т.е. метрическую близость векторов исходных данных). Похожие вектора признаков проецируются в нейроны, расположенные близко на карте. Т.о., объекты, близкие в исходном пространстве остаются близкими и на плоскости карты (**рис. 1, в**). Алгоритм может подсчитывать количество анализируемых признаков, попадающих в каждый нейрон и отображать их количество (например, как на **рис. 1, г**) величиной закрашиваемой площади нейрона. Подгонка СОКК заключается в итеративной настройке вектора весовых коэффициентов каждого нейрона в выходном слое, для чего используется модифицированный алгоритм соревновательного обучения Хебба, действующий по принципу «победитель забирает все», который учитывает не только вклад нейрона-победителя, но и ближайших его соседей, расположенных в его окрестности. При обучении стека нейронов деформируется, увеличивая плотность узлов (нейронов) в местах сгущения данных при обучении (**рис. 1, д**). Места скопления нейронов, в которых концентрируются вектора анализируемых данных, закрашиваются одним цветом – это выявленные кластеры. В зависимости от объема и его «давления», карта деформируется, формируется низменность, (овраг, залив, море). По этой причине плоскость, на которую проецируются анализируемые данные (входные вектора), названа картой.

Процедура анализа многомерных данных состоит из двух шагов:

Сначала сетевым алгоритмом выявляется и визуализируется на плоскости структура многомерных данных (строится так называемая U матрица, раскрашивающая «экран» цветами в соответствии с **расстояниями** между анализируемыми входными векторами-признаками). Синий цвет кодирует малые расстояния (большую схожесть признаков), а красный цвет – границы между выявленными кластерами. Т.о. области, закрашенные алгоритмом обучения в синий цвет, выделяют и визуализируют кластеры (близкие по свойствам объекты), а области, закрашенные в цвета красно-оранжевой гаммы, характеризуют границы между выявленными кластерами.

На следующем этапе алгоритм «раскрашивает» «экран» с выявленной кластерной структурой цветами, которые кодируют уже **значения** признаков (красный – высокие значения, а синий цвет – малые значения признаков). Для численных экспериментов с этим типом сетей нами использована программная среда *Матлаб* и библиотеки *SOM Toolbox*, разработанной фирмой *Mathworks* [17].

Результаты

Структура многомерных данных крови в норме и при ХЛЛ

Для выявления структуры в данных пациентов с ХЛЛ применен метод СОКК (**рис. 2**).

На **рисунке 2 (а)** приведена U-матрица (матрица схожести) для двух групп – больных ХЛЛ и здоровых людей. В данных выделена структура, обнаружены два кластера, обозначенные цифрами 1 и 2. Граница между кластерами представлена «хребтом», маркированным пунктирной кривой. Кроме того видно, что данные в кластере 2 очень неоднородны: в правом верхнем углу возвышается «гора». В этой области сконцентрированы записи данных (вектора) пациентов, которые сильно отличаются друг от друга, это область разнородных данных. Она выделена во втором кластере при помощи тонкой черной кривой.

Простое обнаружение структуры в данных, без поиска ее связи с групповой принадлежностью (т.е. с ХЛЛ или с нормой), не несет смысловой нагрузки. Поэтому в правой части **рисунка 2 (б)** приведен результат маркирования нейронов сети СОКК метками принадлежности к одной из двух сравниваемых групп: здоровых людей (метка «DONOR») и пациентов с ХЛЛ (метка «CLL»). Пунктирной кривой показана обнаруженная граница между кластерами, а тонкой кривой в левом нижнем углу показана область высокой неоднородности данных во втором кластере. Видно, что выявленная структура точно совпадает с расставленными метками групповой принадлежности. Необходимо отметить, что алгоритм, при выявлении структуры ничего «не знает» о распределении векторов по группам, эта информация не используется в процессе обучения, то есть обучение сети СОКК идет, как говорят в машинном обучении, «без учителя». После обнаружения структуры в многомерных данных, была дана медико-биологическая интерпретация выявленной кластерной структуры. Для этого на **рисунке 3** представлено распределение всех анализируемых признаков по матрице схожести.

В левом верхнем углу рисунка приведена найденная в данных структура – U-матрица (матрица схожести). Далее располагаются рисунки с распределением по поверхности этой матрицы значений всех анализируемых признаков. В случае с ХЛЛ все признаки делятся на две группы – явно контрастирующие и «шумящие». Причем, к признакам с выраженной контрастной границей между кластерами относится 9 признаков: процент лимфоцитов, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD22 и HLA-DR. Три признака из этой группы (CD4, CD8 и CD16) контрастируют кластерную структуру, но они характе-

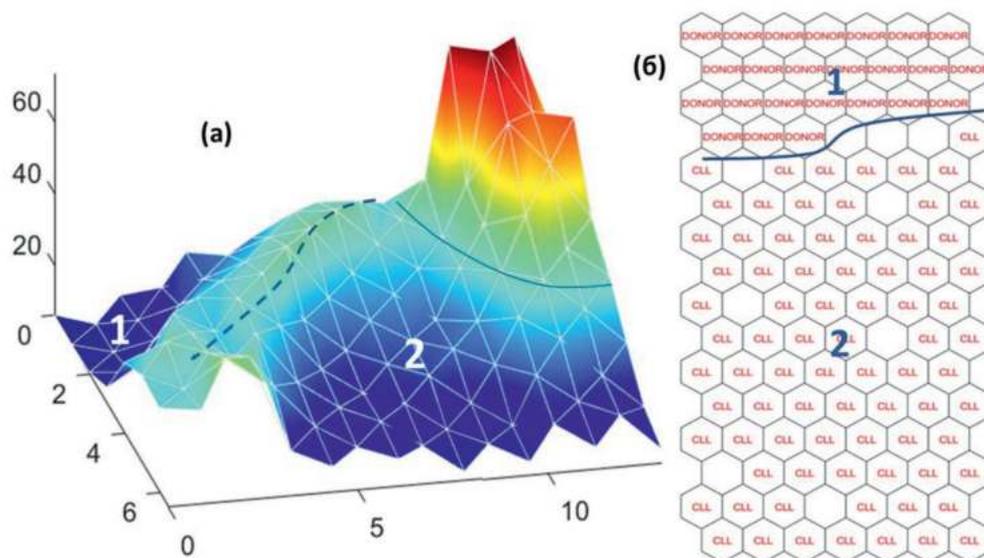


Рис. 2. Результаты выявления структуры в многомерных данных, собранных по показателям для 2 групп испытуемых – пациентов с ХЛЛ и условно здоровых людей (доноров крови).

(a) – U-матрица, иллюстрирующая выявленную в многомерных данных структуру; (б) – размещение на U-матрице цветowych меток, характеризующих принадлежность к 2-м группам (метки – «DONOR» – здоровые люди, «CLL» – пациенты с ХЛЛ).

Fig. 2. Results of identifying structure in multidimensional data collected according to indicators for 2 groups of subjects – patients with CLL and apparently healthy people (blood donors).

(a) – U-matrix illustrating the structure identified in multidimensional data; (б) – placement of color marks on the U-matrix, characterizing membership in 2 groups (marks – “DONOR” – healthy people, “CLL” – patients with CLL).

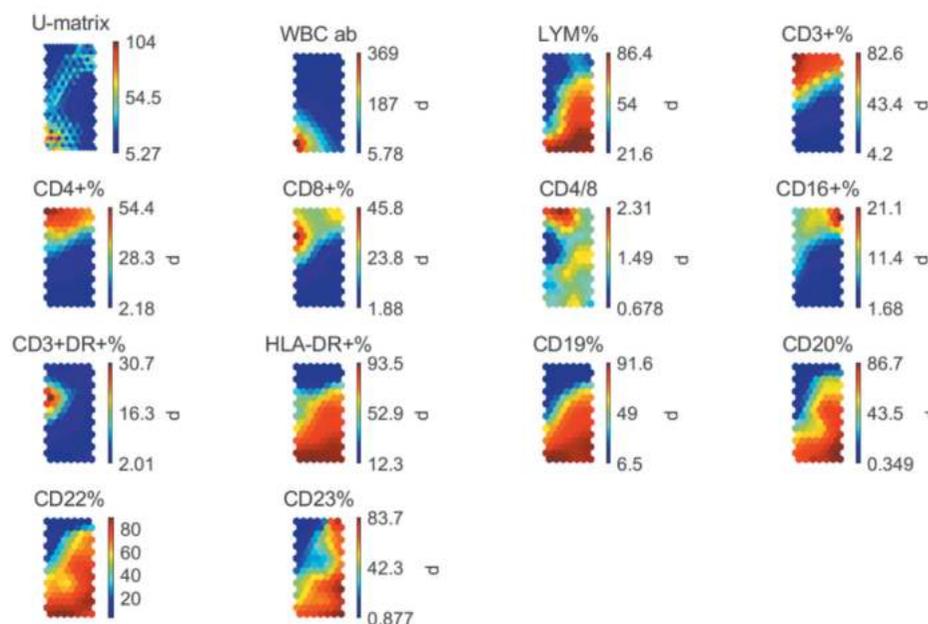


Рис. 3. «Окрашивание», выявленной в многомерных данных пациентов с ХЛЛ и здоровых людей структуры (U-матрицы), значениями признаков, формирующих многомерный образ состояния крови пациентов и здоровых людей.

В левом верхнем углу расположена полученная в результате обучения U-матрица, иллюстрирующая найденную в данных структуру. На остальных полях располагаются закодированные цветом значения анализируемых признаков (синий цвет на этих полях – малые значения соответствующего признака, а красный цвет – большие значения признаков).

Fig. 3. «Coloring» of the structure (U-matrix) identified in the multidimensional data of patients with CLL and healthy people, with the values of features that form a multidimensional image of the blood condition of patients and healthy people.

In the upper left corner is the U-matrix obtained as a result of training, illustrating the structure found in the data. The remaining fields contain color-coded values of the analyzed characteristics (blue color in these fields indicates small values of the corresponding characteristic, and red color indicates large values of the characteristics).

ризуются большой внутригрупповой вариативностью. Шесть признаков (лимфоциты, CD3, CD19, CD 20, CD22 и HLA-DR) имеют очень контрастную границу между группами и обладают для группы здоровых людей и пациентов с ХЛЛ низкой внутригрупповой вариативностью. Чтобы наглядно показать причины этих различий, для сравниваемых групп были построены гистограммы распределений этих признаков (рис. 4).

Вид и взаимное расположение распределений признаков групп здоровых (синий цвет) и пациентов с ХЛЛ (красный цвет) показывают, что, даже при схожих интервалах варьирования (частично перекрывающихся), эти признаки сильно различаются по средним значениям. Так, при значительно перекрывающихся значениях признака «лимфоциты» (рис. 6, г), его средние значения различаются достаточно сильно (около 30% в норме и 75% для пациентов с ХЛЛ). Аналогичная картина наблюдается и для признака CD16: значения сред-

них показателей различны, не смотря на достаточно сильное перекрытие диапазонов. Для остальных признаков картина существенно контрастнее; например, для HLA-DR и CD19.

Оставшаяся группа из 4-х признаков: абсолютное количество лейкоцитов крови, соотношение CD4/CD8, проценты CD3+DR и CD23, бесполезна для разделения состояния здоровья в норме от пациентов с ХЛЛ. Значения этих признаков вариативны и лежат в похожих по значениям диапазонах.

В таблице 1 приведены средние значения для сравниваемых признаков и стандартные ошибки среднего с доверительным уровнем 97,5 % для групп пациентов с ХЛЛ и здоровых людей.

Данные таблицы 1 совместно с рисунком 4 подтверждают вывод о необходимости многомерного анализа данных и сравнения структурных паттернов показателей крови здоровых людей и пациентов с ХЛЛ.

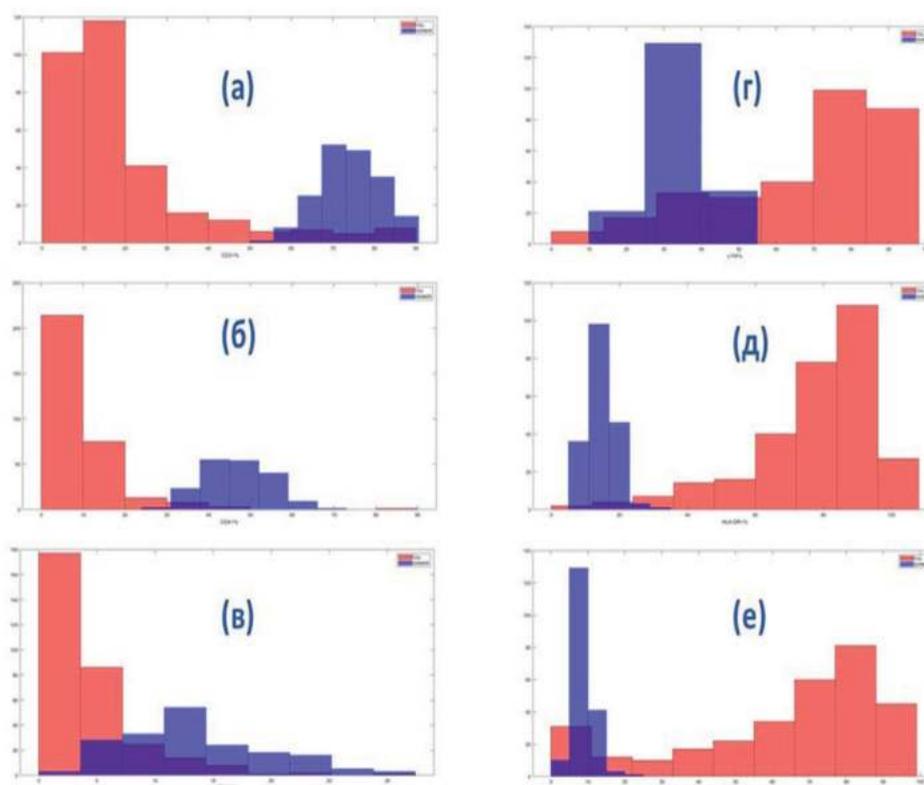


Рис. 4. Гистограммы распределения значений признаков, контрастных и «шумящих» в структуре многомерных данных пациентов с ХЛЛ и здоровых людей. Приведен процент клеток: (а) – CD3, (б) – CD4, (в) – CD16, (г) – лимфоциты, (д) – HLA DR, (е) – CD19.

Красным цветом маркированы гистограммы для больных ХЛЛ, а синим цветом – для здоровых людей.

Fig. 4. Histograms of the distribution of values of features, contrasting and «noisy» in the structure of multidimensional data from patients with CLL and healthy people. The percentage of cells is given: (a) – CD3, (b) – CD4, (c) – CD16, (d) – lymphocytes, (e) – HLA DR, (f) – CD19.

Histograms for patients with NHL are marked in red, and those for healthy people are marked in blue.

Таблица 1/Table 1

Статистические оценки показателей крови для групп ХЛЛ и нормы (доноры)

Statistical estimates of blood parameters for CLL groups and norms (donors)

ХЛЛ										
	Лейкоциты	LYM%	CD3+%	CD4+%	CD8+%	CD4/8	CD16+%	CD3+DR+%	HLA-DR+%	CD19%
Среднее	74,50	67,50	19,20	9,20	9,90	1,40	4,40	8,20	77,00	71,30
Ошибка среднего (97,5%)	5,20	1,32	1,04	0,51	0,72	0,06	0,24	0,68	1,08	1,42
Контроль (доноры)										
Среднее	6,10	33,30	74,10	46,10	26,80	1,80	13,60	5,40	14,20	7,90
Ошибка среднего (97,5%)	0,09	0,53	0,53	0,57	0,43	0,04	0,45	0,21	0,30	0,20

Примечание. Все десять показателей в сравниваемых группах статистически значимо различаются ($p < 0,025$).

Note. All ten indicators in the compared groups are statistically significantly different ($p < 0,025$).

Структура многомерных данных крови в норме и при НХЛ

Далее, был проведен аналогичный анализ по выявлению и сравнению структуры многомерных данных крови пациентов с НХЛ и здоровых людей.

На **рисунке 5, (а)** приведен результат обучения сети SOM на массиве многомерных данных, представленных 13 признаками (см. раздел «Методика»). Как видно из рисунка, в данных не выявлено четкой структуры,

но в данном случае это не означает отсутствие структуры вообще. На заднем плане рисунка формируется «возвышение», которое можно интерпретировать как начало границы, идущей с заднего плана, исчезающей при приближении к передней границе рисунка.

На **рисунке 5, (а)** показана матрица расстояний (похожести объектов). Из этого рисунка следует, что алгоритм не нашел в многомерных данных четко выделяемых кластеров. Но при маркировке нейронов сети СОКК метками групповой принадлежности (здоровым

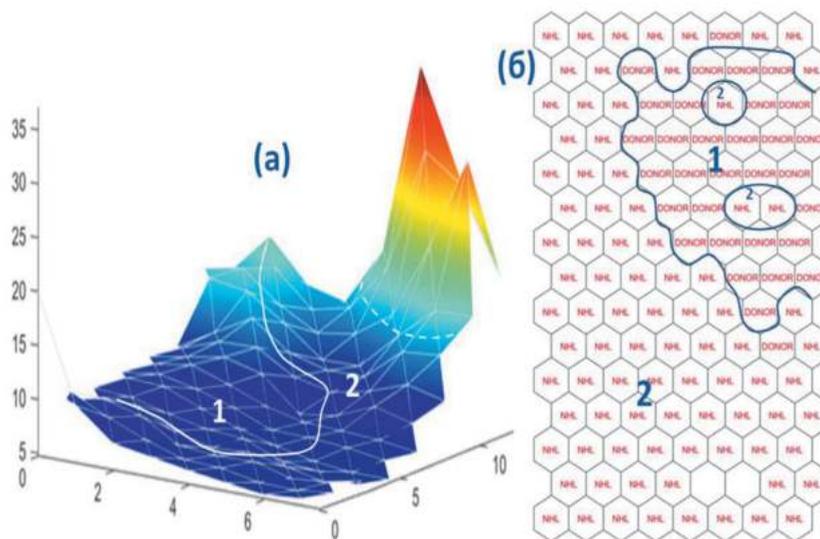


Рис. 5. Результаты выявления структуры в многомерных данных, собранных по показателям для 2 групп испытуемых – пациентов, страдающих НХЛ и условно здоровых людей (доноров крови).

(а) – U-матрица, иллюстрирующая выявленную в многомерных данных структуру; (б) – размещение на U-матрице меток, характеризующих принадлежность к 2-м группам (метка «DONOR» – здоровые люди, «NHL» – пациенты с НХЛ).

Fig. 5. Results of identifying structure in multidimensional data collected according to indicators for 2 groups of subjects – patients suffering from NHL and relatively healthy people (blood donors).

(а) – U-matrix illustrating the structure identified in multidimensional data; (б) – placement on the U-matrix of labels characterizing membership in 2 groups (label «DONOR» – healthy people, «NHL» – patients with NHL).

людям присвоена метка 1, а НХЛ – метка 2, которые не разделены на карте «хребтом», но мы маркировали ее белой кривой, идущей через карту. «Высота» хребта невелика, и в передней части **рисунка 5, (а)** он исчезает вообще; что обусловлено большой неоднородностью 2 кластера. В левом верхнем углу карты располагается «гора», довлеющая над всем «ландшафтом» (по периметру обведена линией). Ее наличие говорит, что в этой области карты локализованы очень непохожие на остальные и сильно отличающиеся друг от друга признаки, т.е. представлены данные с большой неоднородностью. Именно по этой причине «хребет», разделяющий карту (и данные) на два кластера представлен на карте едва различимой границей. Чтобы выяснить соотносятся ли выделенные в данных кластеры с принадлежностью данных к группе НХЛ или к норме, в правой части **рисунка 5, (б)**, на котором выделенная в данных структура (показана синей кривой), маркирована символами принадлежности векторов к одной из двух групп – пациентов с НХЛ (метка «NCL») и здоровых людей (метка «DONOR»). Используемый

подход (алгоритм СОКК) эффективно разделит анализируемые данные: распределение меток формирует четкий кластер 1 (здоровые люди) и вокруг него кластер 2 (НХЛ).

Следующий шаг алгоритма СОКК – проведение анализа вклада признаков в формирование выявленной в многомерных данных кластерной структуры. На **рисунке 6** показано распределение по U-матрице (левый верхний угол рисунка) значений 13 анализируемых признаков. Среди них не выявлено ярких контрастирующих признаков, формирующих структуру U-матрицы. Только 3 из них слабо ее выделяют. Это признаки CD4, CD3+DR, HLA-DR. Область U матрицы (**рис. 6, (а)**), обведенная белой кривой, с темно синей окраской (относительно ближайшего окружения) означает, что объекты в этой области (здоровые люди) имеют очень низкие значения этих показателей. При чем CD4 контрастирует структуру с несколько большим эффектом, чем CD3+DR и HLA-DR. Для здоровых людей значения признака CD4 средние и чуть выше средних значений, а для пациентов с НХЛ вектора

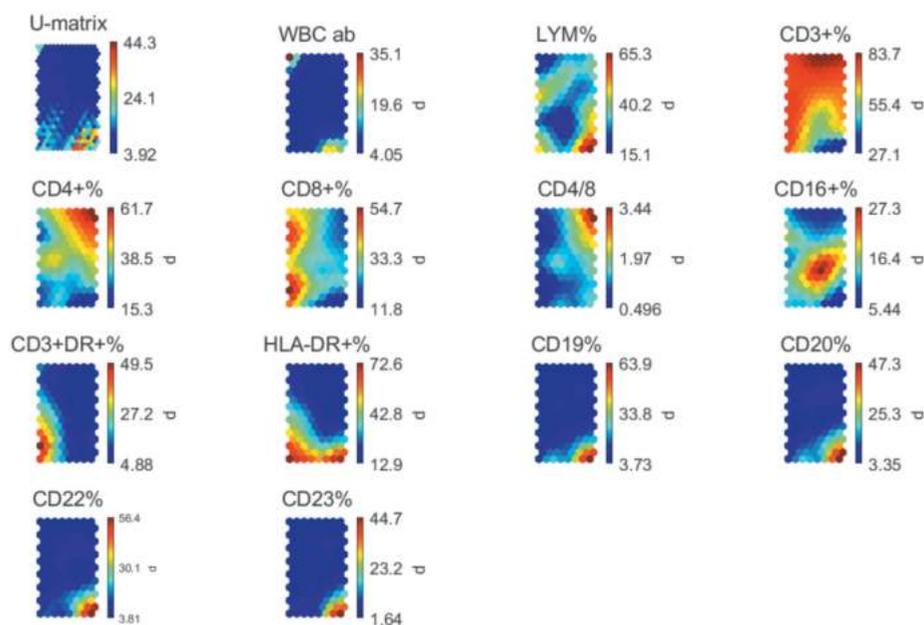


Рис. 6. «Окрашивание» карты структуры (U-матрицы), выявленной в многомерных данных пациентов с НХЛ и здоровых людей, значениями признаков, формирующих многомерный образ состава крови пациентов и здоровых людей. В левом верхнем углу расположена полученная в результате обучения U-матрица, иллюстрирующая найденную в данных структуру. На остальных полях располагаются закодированные цветом значения анализируемых признаков (синий цвет на этих полях – малые значения соответствующего признака, а красный цвет – большие значения признаков).

Fig. 6. «Coloring» the structure map (U-matrix) identified in the multidimensional data of patients with NHL and healthy people, with the values of features that form a multidimensional image of the blood composition of patients and healthy people. In the upper left corner is the U-matrix obtained as a result of training, illustrating the structure found in the data. The remaining fields contain color-coded values of the analyzed characteristics (blue color in these fields indicates small values of the corresponding characteristic, and red color indicates large values of the characteristics).

CD4 принимают либо очень низкие, либо очень высокие значения. Остальные анализируемые признаки крови для различения групп не пригодны, т.к. их распределения по поверхности U матрицы (матрицы похожести) не отражают найденную в данных структуру.

Обнаруженные факты нуждаются в объяснении. Почему, при отсутствии ярко выраженной структуры в данных, метки кластеров образуют структуру на U матрице, которая отражает групповую принадлежность анализируемых векторов признаков? Почему в кластере 1, содержащем признаки здоровых людей, оказались нейроны (обведены на рис. 5, (б) синими овалами), которые относятся к пациентам с НХЛ? Для ответа на вопросы были построены гистограммы распределений значений признаков, часть из которых представлена на рисунке 7.

Одномерные гистограммы распределений 4х признаков: процентов лимфоцитов (а), CD16 (б), CD3 (в) и HLA-DR (г), показывают, что для всех признаков гистограммы распределений группы здоровых людей (доноров) лежат внутри гистограмм распределений группы пациентов с НХЛ. При этом, средние значения этих

показателей для обеих групп не сильно отличаются друг от друга. Этот факт объясняет, почему алгоритм СОКК не выявил явной структуры в данных. Отсюда следует вывод: распознавание состояния здоровья от состояния болезни НХЛ по одиночным признакам векторов крови практически невозможно.

В таблице 2 для групп пациентов с НХЛ и здоровых людей приведены статистические оценки (среднее и ошибка средних для 97,5% уровня доверительной вероятности) сравниваемых признаков показателей крови.

Таблица 2 совместно с рисунком 7 показывает ошибочность попыток распознавания состояний здоровья и НХЛ по сравнению выборочных средних; практически по всем признакам, при сравнении средних значений, две выборки значимо различаются (за исключением процентов лимфоцитов). Но при этом все гистограммы признаков здоровых людей располагаются внутри интервалов значений гистограмм группы пациентов с НХЛ. Поэтому становится необходимым изучение многомерных образов показателей крови больных и здоровых людей и их сравнение в многомерном

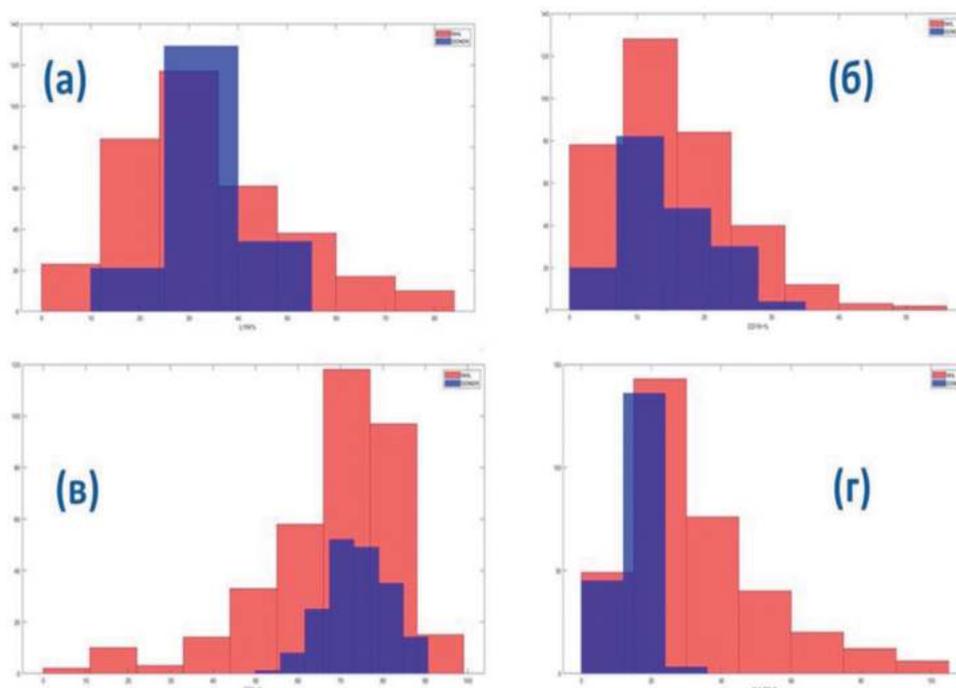


Рис. 7. Гистограммы, иллюстрирующие распределение значений четырех признаков для группы пациентов с НХЛ (красный цвет) и здоровых людей (синий цвет).

Приведены гистограммы распределений 4х признаков: содержание лимфоцитов (а), проценты CD16 (б), CD3 (в) и HLA-DR (г) клеток.

Fig. 7. Histograms illustrating the distribution of four feature values for a group of NHL patients (red) and healthy controls (blue).

Histograms of distributions of 4 characteristics are presented: the content of lymphocytes (a), percentages of CD16 (b), CD3 (c) and HLA-DR (d) cells.

Таблица 2/ Table 2

Статистические оценки показателей крови для групп НХЛ и контроля (доноры)

Statistical estimates of blood parameters for the NHL and control (donor) groups

НХЛ										
	Лейкоциты	LYM%	CD3+%	CD4+%	CD8+%	CD4/8	CD16+%	CD3+DR+%	HLA-DR+%	CD19%
Среднее	7,7	33,3	67,5	36,0	32,5	1,4	14,7	16,1	32,2	11,8
Ошибка среднего (97,5%)	0,54	0,87	0,87	0,73	0,72	0,06	0,49	0,70	1,05	0,84
Контроль (доноры)										
Среднее	6,1	33,3	74,1	46,1	26,8	1,8	13,6	5,4	14,2	7,9
Ошибка среднего (97,5%)	0,09	0,53	0,53	0,57	0,43	0,04	0,45	0,21	0,30	0,20

Примечание. Девять показателей из десяти в сравниваемых группах статистически значимо различаются ($p < 0,025$). Статистически не значимы различия для показателя Лф%.

Note. Nine out of ten indicators in the compared groups are statistically significantly different ($p < 0.025$). The differences for the Lf% indicator are not statistically significant.

пространстве для выявления структуры и оценки возможности построения автоматических диагностических процедур. То есть, распознавание двух анализируемых состояний (НХЛ и норма) возможно только при использовании подхода многомерного анализа.

Обсуждение

В качестве первого шага на пути создания автоматизированного алгоритма диагностики ХЛЛ и НХЛ по данным периферической крови методом СОКК был проведен многомерный анализ состояния противоопухолевого иммунитета и признаков В-клеточной лимфопротиферации для двух типов патологии – НХЛ и ХЛЛ – по сравнению со здоровыми людьми.

Выяснено, что этот метод выявил хорошую кластеризацию материала, создавая структурные паттерны НХЛ и ХЛЛ, отличающие каждую патологию от статуса здоровых людей. Эти находки в принципе, дают возможность по образам болезни, отраженным в состоянии периферической крови, отличать патологии ХЛЛ и НХЛ от состояния условной нормы. Диагностика ХЛЛ по крови без многомерного анализа достаточно успешна, и по алгоритму многомерного анализа представляется более простой в выполнении, чем НХЛ, так как большинство признаков, характеризующих иммунитет (CD3, CD4, CD8, CD16) и опухолевый рост (проценты лимфоцитов, CD19, CD20, CD22 и HLA-DR) контрастны для ХЛЛ и нормы. Как известно, нарушение баланса в противостоянии «иммунитет-опухоль» в первую очередь обусловлено эффекторами врожденного (CD16+NK-клеток) и специфического иммунитета (CD4 и CD8T-клеток), а также темпами прироста опухолевых клеток. От числа и качества функционирования клеток иммунной системы, наряду с особенностями злокачественного роста, за-

висит течение и прогноз болезни. Отмечено, что снижение показателей состояния иммунитета оппозитно возрастанию признаков лимфопротиферации, повышение которых отражает процесс постепенного накопления, а затем и явного доминирования опухолевых В-клеток в общей популяции лимфоцитов периферической крови. Кластерная структура данных, выявленная методами ИНС при ХЛЛ, наглядно отражает эти проявления конфронтации и этапов капитуляции противоопухолевого иммунитета при развитии опухолевого роста [18–20], что может быть использовано для построения автоматизированного алгоритма диагностики состояния здоровья (условная норма) и патологии – ХЛЛ.

Прежде было показано [5, 21–23], что при ХЛЛ и НХЛ в разной степени активирован иммунитет за счет повышения уровня CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ и регуляторных супрессорных T-reg клеток. При ХЛЛ рост их числа намного ниже темпов прироста опухолевых клеток. Нарастающая диспропорция NK- и T-клеток с уровнем опухолевых В-лимфоцитов в крови отражает этапы развития недостаточности и истощения T- и NK-клеточного иммунитета, в том числе за счет его гиперактивации. Механизмы отрицательной негативной регуляции снижают и останавливают развитие иммунного ответа. Факторами, снижающими эффективность активации T-лимфоцитов при ХЛЛ, считают структурные мутационные изменения В-клеток, плохо представляющие антиген T-клеткам при индукции иммунного ответа. В таком случае, генерация и передача сигнала активации слаба или отсутствует вовсе вследствие недостаточного стереосближения взаимодействующих клеток при формировании иммунного синапса. Причинами, тормозящими развитие иммунного ответа, могут быть нарушения внутри-

клеточного транспорта везикул и функционирования цитоскелета цитотоксических Т-клеток [24–26] и других опухолевых воздействий, редактирующих иммунный ответ [18–20].

Таким образом, СОКК анализ по данным периферической крови легко различает состояние здоровья и ХЛЛ по ключевым признакам, отражающим взаимоотношения «иммунитет – зрелоклеточная лимфопротиферация», что может быть использовано для создания автоматизированного алгоритма отличия нормы от ХЛЛ.

Структура же многомерного образа иммунитета здоровых людей включена в состав структуры НХЛ, частично ее перекрывает. Эта ее особенность может быть объяснена меньшей частотой и степенью выхода опухолевых клеток в кровь при НХЛ, когда первичный лимфопротиферативный процесс изначально локализован в лимфатических узлах (нодальные формы НХЛ) или тканях, богатых лимфоцитами (тканевые экстранодальные формы НХЛ типа MALT-лимфом). При этом реже поражается костный мозг и опухолевые клетки в значительно меньшем количестве выходят в циркуляцию крови. Выраженность лейкемизации крови при НХЛ, по-видимому, связана с особенностями транслокаций в геноме В-клеток, местонахождением опухолевых клеток относительно герминального центра лимфоузла (прегерминальные, центрофолликулярные и постгерминальные НХЛ), а также эпигеномными нарушениями регуляции роста клеток [4, 6, 7]. Клетки разных нозологических форм НХЛ обладают разной пролиферативной активностью и с разной частотой обнаруживаются в циркулирующей крови [27].

Многомерные структуры НХЛ и нормы различаются в большей степени по уровню CD4+Т-хелперов, активации Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+) и уровню клеток, экспрессирующих HLA-DR+ (нормальные и опухолевые В-клетки, активированные Т-лимфоциты). Структурирование многомерных данных создает возможность построения алгоритма диагностики НХЛ, например, определенным образом стратифицируя сочетания разной степени CD4+Т-хелперов и активационного статуса Т-клеток с разным уровнем опухолевой пролиферации и нарушениями других иммунологических параметров. При этом многомерный анализ указывает, что построение алгоритма диагностики НХЛ окажется сложнее и будет включать большее число шагов по сравнению с алгоритмом диагностики ХЛЛ.

Таким образом, в настоящем исследовании изучена возможность и определены перспективы применения методов ИНС для создания алгоритма автоматической диагностики ХЛЛ и НХЛ, за счет оптимизации анализа иммунограмм крови без необходимости

использования клеток лимфатических узлов, костного мозга, других органов и тканей. Следует специально отметить, что диагностика локализованной (без проявления лейкемизации) НХЛ по иммунограмме крови до сих пор не могла быть достигнута; необходимо проведение иммуногистохимического и других исследований лимфатических узлов, лимфоидных органов и тканей первичной локализации опухолевого процесса.

Выводы

1. Подтверждена гипотеза о высокой эффективности применения технологии самоорганизующихся карт Кохонена (СОКК) для выявления структур в многомерных массивах экспериментальных данных больных (НХЛ и ХЛЛ) и здоровых людей.

2. Применение данной технологии выявило четкую кластерную структуру как при сопоставлении многомерных данных «ХЛЛ – норма», так и при анализе данных «НХЛ – норма».

3. Доказано, что кластерная структура обусловлена групповой принадлежностью анализируемых данных, т.е. выявленные кластеры соответствуют данным двух исследуемых патологий: ХЛЛ – норма и НХЛ – норма.

4. Многомерный анализ интерпретирует выявленные кластеры за счет уровней значений используемых признаков иммунитета и опухолевых клеток, что логично и не противоречит патофизиологии анализируемых заболеваний.

5. Полученные результаты формируют основу для создания автоматической стратификации процедуры диагностики ХЛЛ и НХЛ.

Литература

(п.п. 1; 6-10; 12-14; 16; 18-24; 26; 27 см. References)

2. Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. *Клиническая онкогематология*. 2012; 5(2): 84-95.
3. Свириновский А. И. Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы. *Медицинские новости*. 2008; 13: 7-19.
4. Луговская С.А., Почтарь М.Е. *Гематологический атлас*. М.: 2016.
5. Кузьмина Е.Г., Мушкарина Т.Ю., Константинова Т.В., Зацаренко С.В. и др. Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови при В-клеточном хроническом лимфолейкозе/лимфоме из малых лимфоцитов. *Клиническая онкогематология*. 2020; 13(4): 395-405.
11. *Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопротиферативных заболеваний*. Под ред. Поддубной И.В., Савченко В.Г. М.: 2018.
15. Зиновьев А. *Визуализация многомерных данных*. Красноярск: 2000.
17. Тант Зин Пью и др. Методика системы распознавания образов с помощью самоорганизующихся карт Кохонена нейронных сетей на основе Matlab. *Интернет-журнал «Науковедение»*. 2013; 5.

25. Бадмажапова Д.С., Гальцева И.В., Звонков Е.Е. и др. Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса при хроническом лимфолейкозе. *Онкогематология*. 2018; 1(13): 103-14. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-103-114
28. Неприна Г.С., Кузьмина Е.Г., Павлов В.В., и др. Иммунофенотипический анализ лимфоцитов костного мозга и периферической крови у больных В-клеточными злокачественными лимфомами. *Медицинская иммунология*. 2006; 8(2-3): 347-8.

References

1. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol*. 2021; 96(12): 1679-705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>
2. Kazansky D.B. T-lymphocytes in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Oncohematology. Basic research and clinical practice. Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012; 5(2): 84-95. (in Russian)
3. Svirnovsky A.I. Chronic lymphocytic leukemia: paradigms and paradoxes. *Meditsinskie novosti*. 2008; 13: 7-19. (in Russian)
4. Lugovskaya C.A., Pochtar M.E. *The Hematological Atlas. [Gematologicheskii atlas]*. Moscow: 2016. (in Russian)
5. Kuzmina E.G., Mushkarina T.U., Konstantinova T.V., Zacarenco S.B., et al. Subpopulation composition of immunocompetent peripheral blood cells at B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma from small lymphocytes. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2020; 13(4): 395-405. (in Russian)
6. Zhang X., Wang H., Zhang Y., Wang X. Advances in epigenetic alterations of chronic lymphocytic leukemia: from pathogenesis to treatment. *Clin Exp Med*. 2024; 24(1): 54. <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01268-x>
7. Hacken E., Burger J.A. Microenvironment interactions and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: implications for disease pathogenesis and treatment. In: *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, Amsterdam: Elsevier B.V. 2016; 1863: 01–13.
8. Campo E., Jaffe E.S., Cook J.R., Quintanilla-Martinez L., Swerdlow S.H., et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022; 140(11): 1229-53. doi: 10.1182/blood.2022015851. *Erratum in: Blood*. 2023; 141(4): 437. PMID: 35653592; PMCID: PMC9479027
9. Swerdlow S.H., Campo E., Pileri S.A., et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20): 2375–90. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569
10. Rawstron A.C., Kreuzer K.A., Soosapilla A., et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018; 94: 121-8.
11. *Russian clinical recommendations for the diagnosis and treatment of lymphoproliferative diseases. [Rossiyskie klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu limfoproliferativnykh zabolevaniy]*. Ed., Poddubny I.V., Savchenko B.G. Moscow: 2018. (in Russian)
12. Cree I.A. The WHO Classification of Haematolymphoid Tumours. *Leukemia*. 2022; 36(7): 1701–2. DOI: 10.1038/s41375-022-01625-x
13. Kohonen, Essentials of the self-organizing map, *Neural Networks*. 2013; 37: 52–65.
14. Dubravko Miljković, Brief Review of Self-Organizing Maps, *MI-PRO. May Opatija, Croatia*. 2017; 22- 6.
15. Zinoviev A. *Visualization of multidimensional data. [Vizualizatsiya mnogomernykh dannyykh]*. Krasnoyarsk, 2000. (in Russian)
16. Zhang Ji, Hai Fang, Using Self-Organizing Maps to Visualize, Filter and Cluster, in: *Applications of Self-Organizing Maps*, chapter 9, Edited by Magnus Johnsson. 2012.
17. Tant Zin Piot, et al. Methodology of pattern recognition system using self-organizing maps of Kohonen neural networks based on Matlab. *Journal of Science*. 2013; 5 (in Russian)
18. Mathworks Inc., Self Organising Maps Toolbox, <https://www.mathworks.com>.
19. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3(11): 991–8. DOI: 10.1038/ni1102–991. PMID: 12407406
20. Mitta I.D., Gubin M.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. New insights into cancer immunoeediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin. Immunol*. 2014; 27: 16–25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004
21. Chen D.S., Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 2013; 39: 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
22. Dianzani U., Omedè P., Marmont F., et al. Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease status and neoplastic phenotype. *Blood*. 1994; 8 (83): 2198-205.
23. Jadidi-Niaragh F., Yousefi M., Memarian A., et al. Increased Frequency of CD8+ and CD4+ Regulatory T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with Disease Progression. *Cancer Investigation*. 2013; 2(31): 121–31. DOI: 10.3109/07357907.2012.756110
24. Mackus W.J., Frakking F.N., Grummels A., et al. Expansion of CMV-specific CD8+CD45RA+CD27- T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003; 3(102): 1057-63. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0182
25. Badmazhapov D.C., Galtseva I.V., Zvonkov E.E., et al. Features of antigen expression, involved in the formation of an immunological synapse, with chronic lymphocytic leukemia. *Oncohematology*. 2018; (13): 103-14. (in Russian) DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-103-114
26. Ramsay A.G., Johnson A.J., Lee A.M., et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *Journal of Clinical Investigation*. 2008; 7(118): 2427–37. DOI: 10.1172/JCI35017
27. Daniel D. Billadeau, Janis K. Burkhardt. Regulation of Cytoskeletal Dynamics at the Immune Synapse: New Stars Join the Actin Troupe. *Traffic*. 2006; 7(11): 1451–60. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00491
28. Neprina G.S., Kuzmina E.G., Pavlov V.V., et al. Immunophenotypic analysis of bone marrow lymphocytes and peripheral blood in patients B-cell malignant lymphomas. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006; 8(2-3): 347-8. (in Russian)

Сведения об авторах:

Кузьмина Евгения Геннадьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отд-ния клинической иммунологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;

Черкашенко Владимир Николаевич, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

Павлов Вячеслав Владимирович, канд. мед. наук, врач-гематолог отд-ния лучевой и лекарственной терапии гемобластозов МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;

Мушкарин Татьяна Юрьевна, науч. сотр. клинической иммунологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;

Антонов Кирилл Николаевич, студент факультета вычислительной математики и кибернетики ВМК ФГБОУ ВО «МГУ им. Ломоносова»;

Устинова Екатерина Евгеньевна, мл. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

Богданенко Елена Валентиновна, ст. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

Сабурин Ирина Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-006.4

Сабурин И.Н.², Кузьмина Е.Г.¹, Черкашенко В.Н.², Павлов В.В.¹, Зацаренко С.В.¹, Антонов К.Н.³, Богданенко Е.В.², Устинова Е.Е.², Морозов С.Г.²

Сравнительный анализ структурных особенностей многомерных данных периферической крови при хроническом лимфоцитарном лейкозе и неходжкинской В-лимфоме

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, 249031, Обнинск, Россия, ул. Королева, д. 4;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1

Актуальность. Правильная идентификация лимфолиферативных заболеваний хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и неходжкинских В-клеточных лимфом (НХЛ) является ключевым этапом скрининга, который требует высокой точности и интерпретируемости. Поэтому разработка современных методов дифференциальной диагностики НХЛ и ХЛЛ по-прежнему актуальна. Неинвазивные методы дифференциальной диагностики на основании исследований с последующим математическим анализом при помощи искусственных нейронных сетей (ИНС) позволят дифференцировать эти заболевания с высокой точностью только по данным крови, не используя материал других органов и тканей. Цель исследования – провести многомерный анализ состава субпопуляций лимфоцитов и опухолевых клеток в периферической крови и оценить взаимосвязи в системе «иммунитет – опухолевый рост», внедрив методы искусственных нейронных сетей (ИНС). Это позволяет выявлять структурные особенности, отличающие НХЛ от ХЛЛ.

Методика. Анализ данных осуществлялся при помощи искусственной нейронной сети-самоорганизующихся карт Кохонена (SOM (self organized map)). Эта ИНС позволяет выявлять структуру в многомерных данных, осуществляя проецирование многомерных образов в пространство пониженной размерности (2-х или 3-х мерное), что не требует принятия каких-либо априорных гипотез о структуре данных.

Результаты. Для построения и поиска различий многомерных образов болезни ХЛЛ от НХЛ были использованы искусственные нейронные сети (ИНС). Состояние иммунитета и опухолевых клеток сопоставлено по данным периферической крови пациентов с В-клеточной НХЛ (352 пациента) с данными ХЛЛ (315 пациентов). Выявлены структуры, отражающие различия состояний «НХЛ – ХЛЛ». Характер распределений и значения показателей иммунитета и опухолевого роста в многомерном пространстве позволяет с высокой точностью различать состояния ХЛЛ – НХЛ, определять стадию развития опухоли и в дальнейшем выбрать правильную тактику лечения.

Заключение. Отличия НХЛ и ХЛЛ, по образам многомерного анализа, создают основу для неинвазивного метода автоматической диагностики патологий НХЛ и ХЛЛ.

Ключевые слова: периферическая кровь; многомерный анализ; иммунитет; опухолевые В-клетки; НХЛ; ХЛЛ

Для цитирования: Сабурин И.Н., Кузьмина Е.Г., Черкашенко В.Н., Павлов В.В., Зацаренко С.В., Антонов К.Н., Богданенко Е.В., Устинова Е.Е., Морозов С.Г. Сравнительный анализ структурных особенностей многомерных данных периферической крови при хроническом лимфоцитарном лейкозе и неходжкинской В-лимфоме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 69-80.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.69-80

Участие авторов: концепция, анализ данных проточной цитофлуорометрии, создание базы клинических и иммунологических данных, статистическая обработка, клинико-иммунологическая интерпретация данных многомерного математического анализа, подготовка рукописи, редактирование текста статьи, общее руководство исследованием – Кузьмина Е.Г.; концепция, применение методов многомерного анализа, подготовка рукописи и иллюстративного материала, редактирование текста статьи – Черкашенко В.Н.; концепция, подготовка и редактирование рукописи, общее руководство исследованием – Сабурин И.Н.; иммунофенотипирование, подготовка иллюстраций, редактирование рукописи – Зацаренко С.В.; клиническая диагностика заболеваний – Павлов В.В.; работа с литературой – Богданенко Е.В.; применение методов многомерного анализа, подготовка иллюстративного материала – Антонов К.Н.; применение методов многомерного анализа, подготовка иллюстративного материала – Устинова Е.Е.; одобрение концепции и рукописи, общее руководство – Морозов С.Г.. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Для корреспонденции: Сабурин Ирина Николаевна, e-mail: saburina@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Saburina I.N.², Kuz'mina E.G.¹, Cherkashenko V.N.², Pavlov V.V.¹, Zacarenko S.V.¹, Antonov K.N.³, Bogdanenko E.V.², Ustinova E.E.², Morozov S.G.²

Comparative analysis of structural features of multidimensional data of peripheral blood in chronic lymphocytic leukemia and non-hodgkin B-lymphoma

¹Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of the National Medical Research Radiological Center the Ministry of Health of the Russian Federation, 4 Koroleva Str., Obninsk, 249031, Russian Federation;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

Relevance. Correct identification of the lymphoproliferative diseases chronic lymphocytic leukemia (CLL) and non-Hodgkin B-cell lymphomas (NHL) is a key screening step that requires high accuracy and interpretability. Therefore, the development of modern methods for the differential diagnosis of NHL and CLL is still relevant. Non-invasive methods of differential diagnosis based on research followed by mathematical analysis using artificial neural networks (ANN) will make it possible to differentiate these diseases with high accuracy only based on blood data, without using material from other organs and tissues. **The purpose of the study** is to conduct a multivariate analysis of the composition of subpopulations of lymphocytes and tumor cells in peripheral blood and evaluate the relationships in the «immunity – tumor growth» system by introducing artificial neural network (ANN) methods. This allows us to identify structural features that distinguish NHL from CLL.

Methods. Data analysis was carried out using an artificial neural network – self-organizing Kohonen maps (SOM (self organized map)). This ANN allows you to identify structure in multidimensional data by projecting multidimensional images into a reduced-dimensional space (2- or 3-dimensional), which does not require the adoption of any a priori hypotheses about the structure of the data.

Results. Artificial neural networks (ANN) were used to construct and search for differences between multidimensional images of CLL disease and NHL. The state of immunity and tumor cells was compared according to peripheral blood data of patients with B-cell NHL (352 patients) with data from CLL (315 patients). Structures reflecting the differences between the states «NHL – CLL» have been identified. The nature of the distributions and values of immunity and tumor growth indicators in multidimensional space allows us to distinguish with high accuracy the conditions of CLL – NHL, determine the stage of tumor development and subsequently select the correct treatment tactics.

Conclusion. The differences between NHL and CLL, according to multivariate analysis, create the basis for a non-invasive method for automatic diagnosis of NHL and CLL pathologies.

Keywords: peripheral blood; multivariate analysis; immunity; tumor B cells; NHL; CLL

For citation: Saburina I.N., Kuz'mina E.G., Cherkashenko V.N., Pavlov V.V., Zacarenko S.V., Antonov K.N., Bogdanenko E.V., Ustinova E.E., Morozov S.G. Comparative analysis of structural features of multidimensional data of peripheral blood in chronic lymphocytic leukemia and non-hodgkin B-lymphoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 69–80. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.69-80

Author's contribution: concept, analysis of flow cytometry data, creation of a clinical and immunological data base, statistical processing, clinical and immunological interpretation of multivariate mathematical analysis data, preparation of the manuscript, editing the text of the article, general supervision of the study – Kuzmina E.G.; concept, application of multivariate analysis methods, preparation of the manuscript and illustrative material, editing the text of the article – Cherkashenko V.N.; concept, preparation and editing of the manuscript, general supervision of the study – Saburina I.N.; immunophenotyping, preparation of illustrations, manuscript editing – Zatsarenko S.V.; clinical diagnosis of diseases – Pavlov V.V.; work with literature – Bogdanenko E.V.; application of multidimensional analysis methods, preparation of illustrative material – Antonov K.N.; application of multidimensional analysis methods, preparation of illustrative material – Ustinova E.E.; approval of the concept and manuscript, general guidance – Morozov S.G. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: *Irina N. Saburina*, chief researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Laboratory of Cell Biology and Developmental Pathology, e-mail: saburina@mail.ru

Information about the authors:

Saburina I.N., <https://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Kuzmina E.G., <https://orcid.org/0000-0002-0728-593X>

Cherkashenko V.N., <https://orcid.org/0009-0009-0071-471X>

Zatsarenko S.V., <https://orcid.org/0000-0002-6335-1401>

Antonov K.N., <https://orcid.org/0009-0009-0091-3591>

Ustinova E.E., <https://orcid.org/0009-0008-8976-0212>

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

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

Financing. The study had no sponsorship

Received 18.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Актуальность. Ранее нами было показана возможность методами многомерного анализа выявлять образы патологии В-клеточной НХЛ и ХЛЛ и отличать их от статуса здоровья по результатам структуризации состояния иммунитета и циркулирующих в крови опухолевых В-клеток. При сравнении многомерных данных пациентов с НХЛ и ХЛЛ с данными здоровых людей выявлены различия в их структуре, позволяющие дифференцировать состояние здоровых людей от пациентов с первой и второй патологией. Наличие общности и различий в структуре многомерных данных больных и здоровых людей позволило высказать гипотезу о возможности построения автоматической классификационной процедуры проведения диагностики для пациентов ХЛЛ и НХЛ. Однако очевидно, что после предварительного предположения о наличии у пациента зрелоклеточной лимфопрлиферации (ХЛЛ/НХЛ), следующим шагом должно следовать проведение дифференциальной диагностики этих патологий (НХЛ или ХЛЛ). Проверка возможности проведения дифференциальной диагностики ХЛЛ и НХЛ по результатам многомерного анализа состояния иммунитета и опухолевых клеток в периферической крови составила основу данного исследования.

Цель данного исследования – проведение многомерного анализа структур, выявляемых по клеточному составу иммунной системы и опухолевых В-клеток в периферической крови пациентов с НХЛ и ХЛЛ, для разработки подходов дифференциальной диагностики данных патологий.

Для достижения цели были сформулированы и решены следующие задачи:

Используя методы искусственных нейронных сетей, ИНС, самоорганизующимися картами Кохонена (СОКК) визуализирован многомерный массив данных и сопоставлено состояние иммунитета и опухолевых В-клеток в периферической крови пациентов с НХЛ и ХЛЛ.

При помощи результатов визуализации данных проведена кластеризация и описаны выявленные в многомерных данных структуры для пациентов в двух группах патологии – НХЛ и ХЛЛ.

Проведен анализ признаков структуры НХЛ и ХЛЛ, и определены показатели, формирующие ее различия, которые могут быть использованы для построения алгоритма автоматизированной дифференциальной диагностики этих заболеваний.

Методика

Объекты исследования. В анализ включены данные клинико-иммунологического обследования 352 паци-

ентов с В-клеточными НХЛ и 315 пациентов с ХЛЛ. Для дифференциальной диагностики ХЛЛ и НХЛ использованы критерии классификации ВОЗ опухолей лимфоидной и кроветворной системы: объективный анализ ультразвукового, магнитно-резонансного обследования пациентов, иммуногистохимического исследования материала лимфатических узлов, тканей и костного мозга, иммунофенотипирования опухолевых клеток крови и костного мозга [1-4].

В группу НХЛ включены пациенты с фолликулярной лимфомой, диффузной крупноклеточной лимфомой, лимфомой из малых лимфоцитов, лимфомой из клеток зоны мантии, лимфомой из клеток маргинальной зоны и более редко встречающиеся нозологические формы. Средний возраст пациентов составил: НХЛ – 60 лет, ХЛЛ – 62 года, что соответствует данным литературы [5].

Обследование больных проведено в 1996–2019 гг.

Оценка состояния иммунитета и опухолевых клеток. По гемограмме подсчитывали количество лейкоцитов, относительное и абсолютное число лимфоцитов. Состав ядросодержащих клеток оценивали в цельной крови после предварительного лизиса эритроцитов лизирующим раствором фирмы BD Biosciences. Далее в лимфоцитарном гейте определяли субпопуляции иммунокомпетентных клеток и иммунофенотип В-лимфоцитов методами 2-6-цветной проточной цитометрии на приборе FACSCan или FACSCanto II (BD Biosciences) [1-3].

Для многомерного анализа состояния иммунитета и признаков В-клеточной пролиферации для каждого пациента были использованы 13 показателей, которые включали количество лейкоцитов, Лц абс, $\times 10^9$ кл/л, процент Лф, общих Т-клеток, $CD3^+CD16^-$; Т-хелперов, $CD3^+CD4^+$ %; Т-киллеров, $CD3^+CD8^+$; иммунорегуляторный индекс, $CD4/CD8$; процент НК-клетки, $CD16^+CD3^-$; активированных Т-клеток, $CD3^+HLADR^+$; активированных лимфоцитов, $HLADR^+$, включая нормальные и опухолевые В-лимфоциты и активированные Т-клетки. Идентификация В-лимфоцитов проведена по маркерам $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$, $CD23^+$.

Методы анализа экспериментальных данных. Визуализация многомерных данных, характеризующих состояние иммунитета и В-клеточной пролиферации, проведена с использованием самоорганизующихся карт СОКК (Self Organizing Maps, SOM), разработанных Т.Кохоненом [6-11]. Этот подход обеспечивает два важных аспекта анализа данных – проецирование многомерных данных в пространство пониженной размерности (плоскость) и визуализацию много-

мерных данных в виде плоской карты и, на ее основе осуществляет кластеризацию, выделяя в построенной двумерной карте кластеры векторов признаков пациентов и здоровых людей с близкими (похожими) характеристиками (рис. 1).

Сети Кохонена относятся к классу сетей, обучение которых производится «без учителя», то есть ре-

зультат обучения зависит только от структуры входных данных. Сеть Кохонена имеет два слоя: входной и выходной, составленный из нейронов упорядоченной структуры (рис. 1, а). Выходной слой называют также слоем топологической карты, или «экраном». Нейроны выходного слоя располагаются в узлах двумерной сетки с прямоугольными или шестиугольными

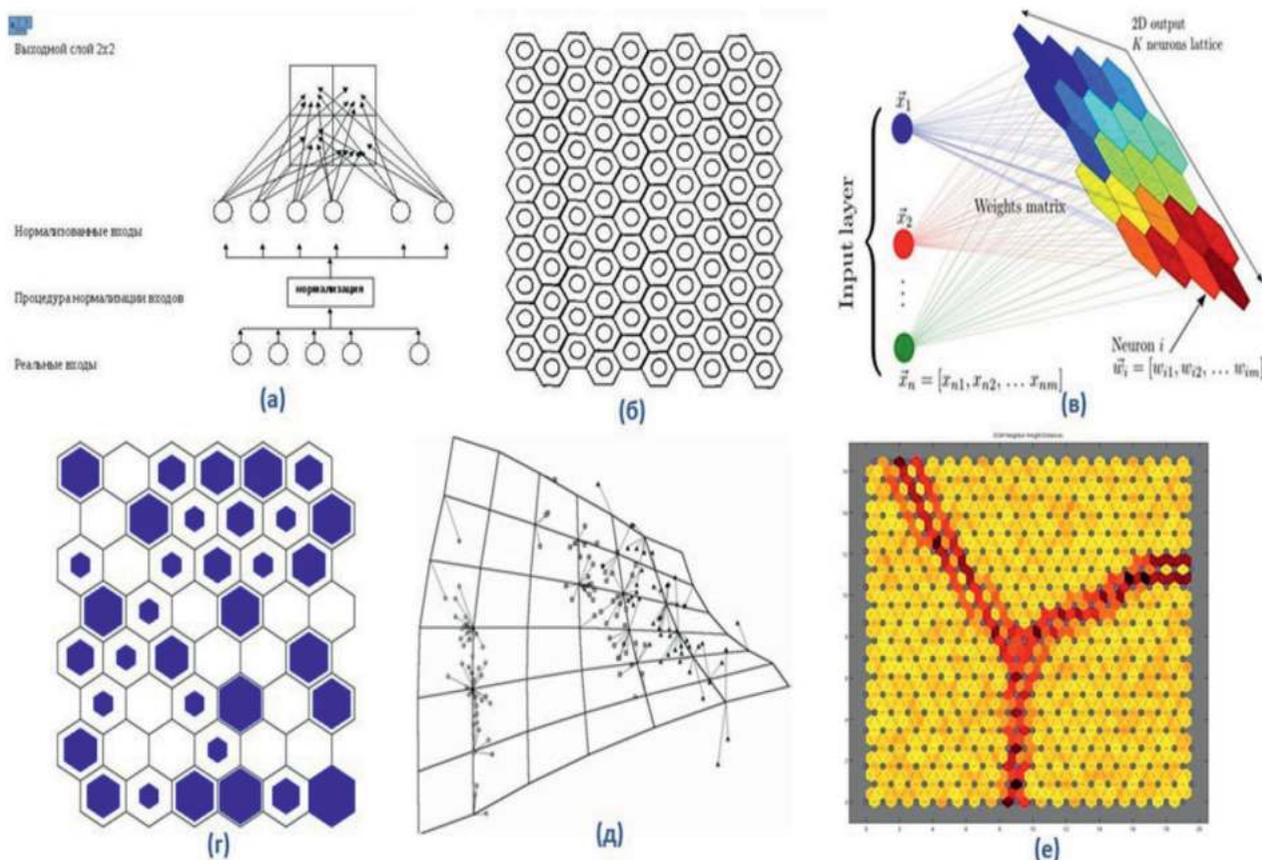


Рис. 1. Иллюстрация алгоритма работы самоорганизующихся сетей Кохонена (SOM).

(а) – архитектура самоорганизующихся сетей Кохонена, (б) – топология элементов (нейронов) СОКК (на рисунке – правильные шестиугольники), (в) – группировка векторов анализируемых данных по степени близости (похожести) – похожие векторы проецируются в одни и те же области карты, (г) – иллюстрация количества анализируемых векторов, попадающих в каждый нейрон сети СОКК пропорционально закрашенной площади каждого нейрона, (д) – алгоритм обучения устроен так, что в местах скопления анализируемых векторов признаков он деформирует сетку и она «прогибается» под «тяжестью» данных в таком нейроне, увлекая за собой и соседние узлы сети, что формирует на карте области с похожими векторами признаков – кластеры данных, (е) – сформированная на сетке структура из 3 кластеров; области, содержащие скопление векторов признаков закрашиваются одним цветом, а области, в которых нет спроецированных векторов признаков – другим, именно они и формируют границы между кластерами.

Fig. 1. Illustration of the algorithm for the operation of self-organizing Kohonen networks (SOM).

(a) – architecture of self-organizing Kohonen networks, (b) – topology of elements (neurons) of the SOCC (regular hexagons in the figure), (c) – grouping of vectors of analyzed data according to the degree of proximity (similarity) – similar vectors are projected into the same areas of the map, (d) illustration of the number of analyzed vectors that fall into each neuron of the SOCC network in proportion to the shaded area of each neuron, (e) – learning algorithm is designed in such a way that in places where the analyzed feature vectors accumulate, it deforms the grid and it «bends» under the «weight» of the data in such a neuron, dragging with it neighboring network nodes, which forms areas on the map with similar feature vectors – data clusters, (e) – structure of 3 clusters formed on the grid; areas containing a cluster of feature vectors are painted with one color, and areas in which there are no projected feature vectors are painted with another color; they form the boundaries between clusters.

ми ячейками (рис. 1, б). Количество нейронов в сетке определяет степень детализации результата работы алгоритма, и зависит от объема данных, в которых пытаются выявить структуру. Самоорганизующиеся карты, в ходе своего обучения, анализируют характер расположения точек входного слоя в m -мерном пространстве и воспроизводят на выходе нейронной сети топологический порядок и определенную степень регулярности исходных данных (т.е. метрическую близость векторов исходных данных). Похожие вектора признаков проецируются в нейроны, расположенные близко на карте. То есть, объекты, близкие в исходном пространстве остаются близкими и на плоскости карты (рис. 1, в). Алгоритм подсчитывает количество анализируемых векторов признаков, попавших в каждый нейрон, и отображает их количество, (рис. 1, г) величиной закрашиваемой площади нейрона. Подгонка SOM заключается в итеративной настройке вектора весовых коэффициентов каждого нейрона в выходном слое, для чего используется модифицированный алгоритм соревновательного обучения Хебба, действующий по принципу «победитель забирает все», который учитывает не только вклад нейрона-победителя, но и ближайших его соседей, расположенных в его окрестностях. При обучении стека нейронов деформируется, увеличивая плотность узлов (нейронов) в местах сгущения данных при обучении (рис. 1, д). Места скопления нейронов, в которых концентрируются вектора анализируемых данных, закрашиваются одним цветом – это выявленные кластеры. В этих местах объем данных «давит» на карту, деформирует и продавливает ее, формирует низменность (овраг, залив, море). Поэтому плоскость, на которую проецируются анализируемые данные (входные вектора), названа картой.

В силу этого, алгоритм формирует на карте области, в которых располагаются похожие друг на друга входные векторы данных, и, тем самым, выявляет и визуализирует кластеры (рис. 1, е).

Процедура анализа многомерных данных состоит из двух шагов:

Сначала сетевой алгоритм выявляет и визуализирует на плоскости структуру многомерных данных (строится так называемая U матрица, раскрашивающая «экран» цветами в соответствии с **расстояниями** между анализируемыми входными векторами-признаками). Синий цвет кодирует малые расстояния (большую похожесть признаков), а красный цвет – границы между выявленными кластерами. Таким образом, области, закрашенные алгоритмом обучения в синий цвет, выделяют и визуализируют кластеры (близкие по свойствам объекты), а области, закрашенные в цвета крас-

но-оранжевой гаммы, характеризуют границы между выявленными кластерами.

На следующем этапе алгоритм раскрашивает «экран» с выявленной кластерной структурой цветами, которые кодируют уже **значения признаков** (красный – высокие значения, а синий цвет – малые значения признаков).

Для численных экспериментов с этим типом сетей нами использована программная среда Матлаб и библиотека SOM ToolBox, разработанная в компании MathWorks [11].

Результаты

Выявление структуры и ее визуализация в многомерных данных НХЛ и ХЛЛ. На рисунке 2 представлена визуализация структуры, выявленной в многомерных данных пациентов с НХЛ и ХЛЛ. В соответствии с алгоритмом, многомерные данные проецируются на плоскость нейронов карты СОКК. В левой части рисунка (рис. 2, а) представлена U-матрица (матрица взаимных расстояний между векторами признаков пациентов в виде трехмерной поверхности). На ней цветом кодируется сходство входных векторов друг с другом.

Далее, с очевидностью, встает вопрос о том, как выделенная и описанная кластерная структура соотносится с групповой структурой данных, т.е. с принадлежностью к группе пациентов ХЛЛ или НХЛ. Для ответа на этот вопрос мы, как и в предыдущей работе, использовали возможность маркировки нейронов сети СОКК текстовыми метками на основании **групповой принадлежности**. Кроме того, метод СОКК позволяет оценивать количество анализируемых входных векторов (данных пациентов), попадающих в каждый из нейронов сети СОКК. На **рисунке 2, (б)** представлена картина распределения векторов признаков, принадлежащих группам пациентов с НХЛ и ХЛЛ. Выделенная кластерная структура в высокой степени соответствует групповой структуре анализируемых данных (поверхность карты разделена границей (кривой), которая повторяет расположение «хребта» на **рисунке 2, (а)**. При этом кластер 1 совпадает с данными группы пациентов НХЛ (верх карты), а кластер 2, в целом, совпадает с данными пациентов ХЛЛ (нижняя часть карты). Кроме того видно, что часть векторов, принадлежащих группе пациентов с ХЛЛ (кластер 2), попадает в кластер 1, что определяет большую вариативность данных группы ХЛЛ из 2 кластера (обозначены овалами на **рисунке 2, (б)**). Также часть векторов пациентов с НХЛ попадает во второй кластер, т.е. расположены ниже границы между кластерами. Они также выделены овалами. Важным моментом, который следует отметить, является

то, что все ошибочные классификации (овалы на рисунке 2, (б)) локализованы в районе границы между кластерами, что свидетельствует о достаточно хорошем представлении кластерной структуры данных.

Далее, для понимания того, какими признаками формируется выявленная кластерная структура, на ри-

сунке 3 показано распределение всех 13 анализируемых показателей по U матрице. Видно, что все анализируемые признаки распадаются на две группы – признаки, контрастирующие кластерную структуру и «шумящие» признаки. В группу сильно контрастирующих кластеры входят 10 признаков: проценты лимфоци-

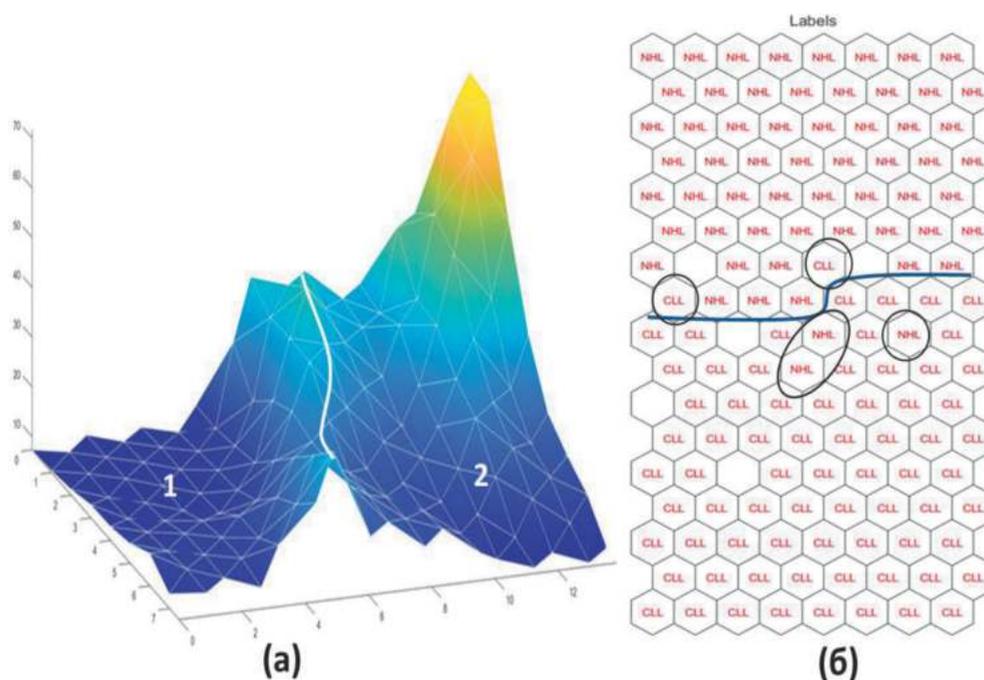


Рис. 2. Выявление структуры в многомерных данных показателей крови для NHL и ХЛЛ по 13 показателям: (а) – U матрица (матрица похожести анализируемых векторов признаков, представленная в виде поверхности) четко выделяет 2 кластера в анализируемых данных (разделены «хребтом», маркированным белой кривой); (б) – наложение на выявленную в многомерных данных структуру групповой принадлежности пациентов (ХЛЛ и NHL). Нейроны на карте СОКК помечены текстовыми метками (CLL – пациенты с ХЛЛ и пациенты с неходжкинской лимфомой – NHL). Овалами обозначены места на карте, в которых в кластеры одной группы попадают пациенты другой группы (ошибки классификации).

Синим цветом на карте маркируются области, в которых содержатся вектора, очень похожие друг на друга. А зелено-желто-красной гаммой представлены области карты, в которых располагаются вектора, менее похожие друг на друга. Как видно из рисунка 2 (а) в многомерных данных пациентов с NHL и ХЛЛ выявлено 2 кластера, которые разделены «хребтом», идущим через всю карту от ее дальней границы к ближней границе. Граница между кластерами обозначена на рисунке линией белого цвета, которая делит плоскость U-матрицы на левую и правую части, обозначенные цифрами 1 и 2 соответственно. Относительно небольшая высота «хребта» определяется тем, что в кластере 2 наблюдается большая неоднородность векторов признаков; в дальнем правом углу карты возвышается «гора» в которой располагаются вектора признаков с очень непохожими свойствами (это определяет большую вариативность признаков пациентов 2 кластера). В многомерных данных пациентов с NHL и ХЛЛ нам удалось четко выделить 2 кластера.

Fig. 2. Identifying structure in multivariate blood data for NHL and CLL according to 13 indicators: (a) – U matrix (similarity matrix of analyzed feature vectors, presented as a surface) clearly identifies 2 clusters in the analyzed data (separated by a «ridge» marked with a white curve); (b) – overlay on the structure of group membership of patients (CLL and NHL) identified in multidimensional data. Neurons on the SOCC map are marked with text labels (CLL patients with CLL and patients with non-Hodgkin lymphoma – NHL). Ovals indicate places on the map where patients from another group fall into clusters of one group (classification errors).

Areas that contain vectors that are very similar to each other are marked in blue on the map. And the green-yellow-red gamma represents areas of the map in which vectors are located that are less similar to each other. As can be seen from Figure 2 (a), in the multidimensional data of patients with NHL and CLL, 2 clusters were identified, which are separated by a «ridge» running across the entire map from its far border to the near border. The boundary between the clusters is indicated in the figure by a white line, which divides the plane of the U-matrix into left and right parts, designated 1 and 2, respectively. The relatively small height of the «ridge» is determined by the fact that in cluster 2 there is a large heterogeneity of feature vectors; in the far right corner of the map there is a «mountain» in which feature vectors with very dissimilar properties are located (this determines the large variability of features of patients in cluster 2). In the multivariate data of patients with NHL and CLL, we were able to clearly identify 2 clusters.

тов и CD3, CD4, CD8, CD16, HLA-DR, CD19, CD20, CD22 и CD23 клеток.

Как видно из **рисунка 3**, по 4-м признакам пациенты с НХЛ обладают большими значениями, чем пациенты с ХЛЛ. Этими признаками являются проценты CD3, CD4, CD8 и CD16 клеток. По остальным 6 контрастирующим признакам наблюдается противоположная картина; по ним пациенты с НХЛ обладают меньшими значениями, чем пациенты с ХЛЛ. К этой группе относятся: проценты лимфоцитов, CD19, CD20, CD22, CD23 и HLA-DR клеток. Все 10 перечисленных ранее признаков, контрастируют кластерную структуру, почти точно повторяя границы выделенных кластеров на **рисунках 2, (а) и 2, (б)**.

К группе «шумящих» признаков относятся 3 признака: абсолютное содержание лейкоцитов, соотношение CD4/CD8 и процент CD3-HLA-DR.

Чтобы наглядно представить, почему показатели демонстрируют контрастность или «шум», представлены гистограммы распределения контрастирующих выявленную кластерную структуру признаков (**рис. 4**).

Все они характеризуются одним общим свойством: имеют противоположную скошенность (третий момент распределения, называемый асимметрией). Например, на **рисунке 4, (а)** значение показателя «% лимфоцитов» имеет правую скошенность для НХЛ и левую скошенность для ХЛЛ. Из статистики известно, что лучшей оценкой средней тенденции для скошенных распределений является мода (величина максимального столбика в гистограмме). Поэтому, на всех четырех рисунках взаимная противоскошенность распределений приводит к тому, что их моды становятся сильно различимыми. Именно по этой причине эти показатели и становятся контрастирующими при многомерном анализе.

Далее рассмотрим гистограммы распределений для трех «шумящих» признаков (**рис. 5**). Видно, что для обеих групп пациентов, и ХЛЛ, и НХЛ, распределения являются право скошенными. Но обращает на себя внимание тот факт, что ушло свойство взаимной скошенности, а моды распределений практически совпадают по величине. Это и приводит к тому, что эти пере-

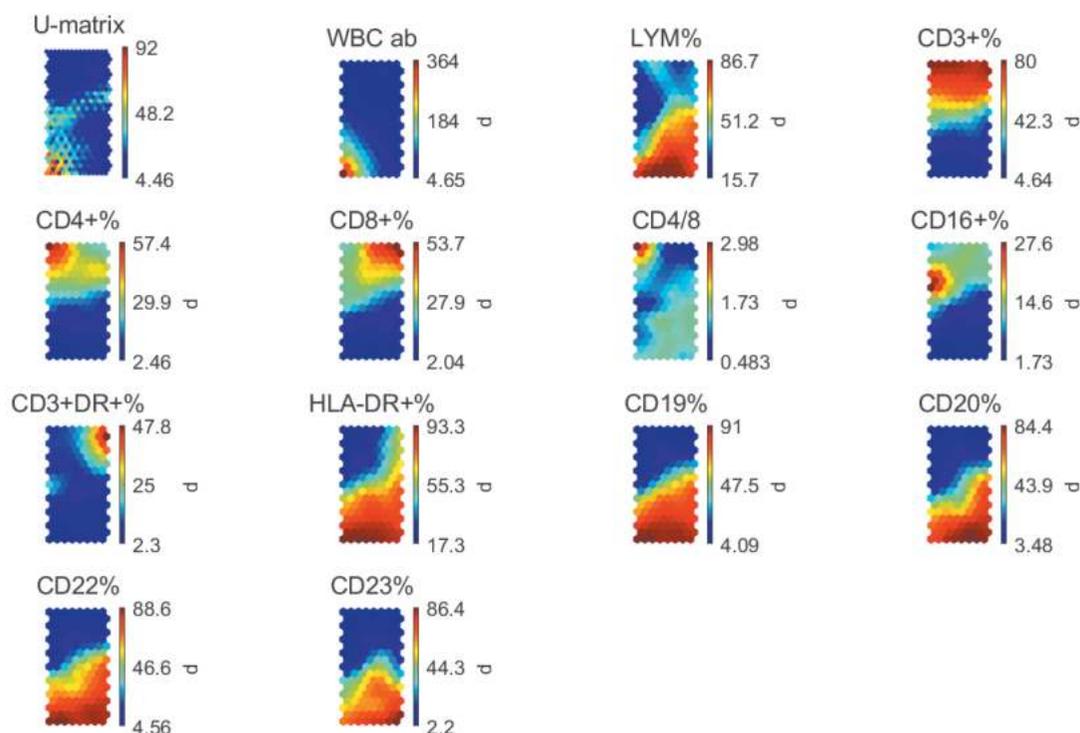


Рис. 3. Распределение значений 13 анализируемых признаков больных НХЛ и ХЛЛ по СОКК. В левом верхнем углу располагается U-матрица с выделенными 2 кластерами и границей между ними (кластер 1 – НХЛ, кластер 2 – ХЛЛ), а остальные рисунки – распределение разных значений 13 признаков по карте (название конкретного признака показано над конкретным элементом рисунка).

Fig. 3. Distribution of values of 13 analyzed signs of patients with NHL and CLL according to SOCC. In the upper left corner there is a U-matrix with 2 highlighted clusters and the boundary between them (cluster 1 – NHL, cluster 2 – CLL), and the rest of the figures are the distribution of values of 13 features on the map (the name of a specific feature is shown above a specific element of the picture).

менные бесполезны для выявления структуры и скорее затрудняют распознавание пациентов разных групп.

Обсуждение

Как известно, выявляемые в крови лимфоциты, находятся в ней недолго, в течение суток многократно, несколько раз покидают ее, мигрируют в лимфоидные органы и ткани и вновь возвращаются. Таким образом, динамичная интегрирующая система крови, как в зеркале, отражает, происходящие в организме изменения, в том числе состояние популяций лимфоцитов и других типов клеток [12]. Мы высказали гипотезу, что имеется возможность разработать алгоритм диагностики вариантов зрелоклеточной лимфопротиферации, НХЛ и ХЛЛ, по различию содержания в периферической крови иммунокомпетентных и опухолевых клеток. При НХЛ наблюдается меньший выход опухолевых клеток в кровь, чем при ХЛЛ [13]. Для нее характерен первичный локальный злокачественный опухолевый рост, исходящий преимущественно из внекостномозговой лимфоидной ткани. Первичное возникновение процесса – лимфатические

узлы (нодальные формы НХЛ) или ткани, богатые лимфоцитами (тканевые экстранодальные формы НХЛ типа MALT-лимфом). В отличие от лейкозов с первичным поражением костного мозга и лейкемическими нарушениями периферической крови, лимфомы возникают в лимфатических узлах и проникают в окружающие ткани. При этом в костном мозге долгое время опухолевые клетки не обнаруживаются или выявляются в минимальном количестве. Значительно реже и в меньшем количестве наблюдаются лейкемические нарушения периферической крови. Степень их проявления при НХЛ во многом обусловлена особенностями транслокаций, произошедших в геноме В-клеток, зоны лимфоузла, относительно герминального центра (прегерминальные, центрофолликулярные и постгерминальные НХЛ), в которой произошла трансформация клеток [1, 14-16]. Опухолевые клетки из разных зон лимфоузла, характеризуются разным активационным статусом, обладают разной пролиферативной активностью и возможностями выхода в циркуляцию.

В противоположность НХЛ, одним из основных диагностических критериев ХЛЛ считается изначаль-

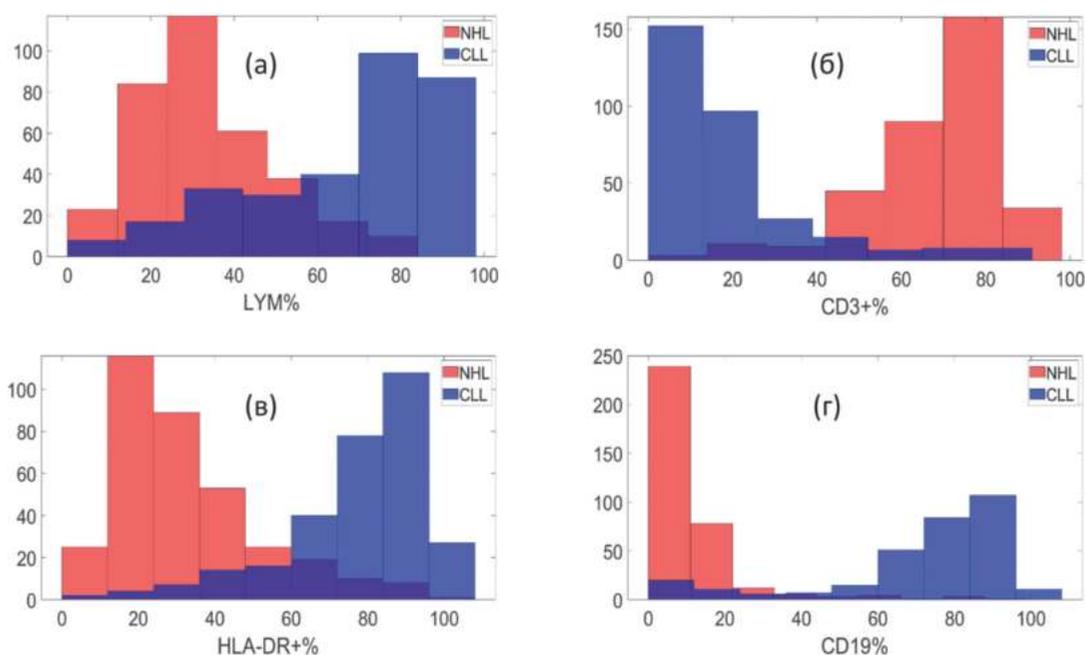


Рис. 4. Гистограммы распределения контрастирующих признаков для выявления структуры в данных пациентов с НХЛ (красный цвет) и ХЛЛ (синий цвет). Область перекрывания данных – фиолетовый цвет.

(а) – % лимфоцитов в крови; (б) – CD3%; (в) – HLA-DR%; (г) – CD19%.

Fig. 4. Histograms of the distribution of contrasting features to identify structure in data from patients with NHL (red) and CLL (blue). The area of data overlap is purple.

(а) – % of lymphocytes in the blood; (б) – CD3%; (в) – HLA-DR%; (г) – CD19%.

ное стойкое обнаружение в крови моноклональных опухолевых лимфоцитов в количестве, превышающем 5×10^9 /л крови. Патологический лимфогенез инициируется онкогенным событием, вызывающим нарушение нормального клеточного цикла. В нем могут действовать два механизма — активация онкогенов либо подавление опухолевых супрессоров (антионкогенов). Транслокации генетического материала в хромосомах при ХЛЛ многочисленны [1, 14-16], опухолевые клетки персистируют, сохраняя жизнеспособность из-за снижения апоптоза, а также за счет изначальной активации клеток и нарушения контроля пролиферации. Злокачественные В-клетки появляются в костном мозге (предполагается, что ХЛЛ может развиваться, помимо других причин, вследствие лейкемогенной трансформации в мультипотентных стволовых клетках) [16], пролиферируют в лимфатических узлах, из-за дефектов апоптоза и снижения супрессорного контроля накапливаются в периферической крови, костном мозге, лимфатических узлах и селезенке [17].

При ХЛЛ у пациентов часто выявляется дисрегуляция иммунного ответа, обусловленная нарушения-

ми противоопухолевого иммунитета. Выраженные дефекты функции Т-клеток описывают как нарушение баланса Т-клеточных субпопуляций, дефективности формирования иммунных синапсов с антигенпрезентирующими клетками, нарушениями киллерной эффекторной функции, повышением уровня регуляторных супрессорных Т-клеток.

Постепенная утрата иммунокомпетентности в поддержании генетического гомеостаза клеточного состава организма в патогенезе зрелоклеточной лимфопротиферации многократно описана [18-20]. Многокомпонентность клеточного состава, осуществляющего иммунный контроль, и многоликость фенотипов опухолевых В-клеток создают представления о зрелоклеточной лимфопротиферации как о многомерном процессе.

Особенности патофизиологии НХЛ и ХЛЛ по признаку различий лейкемизации опухолевого процесса и дисфункции иммунитета, на наш взгляд, можно использовать в качестве критериев, пригодных для дифференциации многомерных структурных образов этих заболеваний.

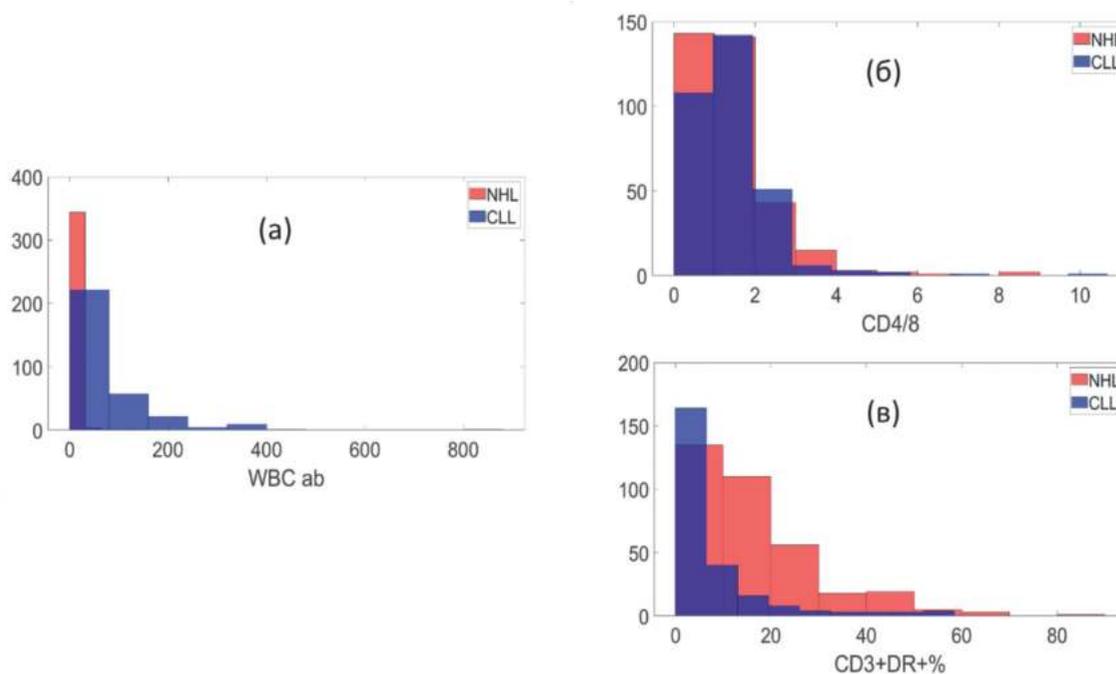


Рис. 5. Гистограммы распределения «шумящих» признаков при анализе обнаруженной кластерной структуры в многомерных данных пациентов с НХЛ (красный цвет) и ХЛЛ (синий цвет). Область перекрытия данных – фиолетовый цвет.

(a) – % лимфоцитов; (б) – иммунорегуляторный индекс, соотношение CD4/CD8; (в) – процент CD3-HLA-DR.

Fig. 5. Histograms of the distribution of «noisy» features when analyzing the detected cluster structure in multidimensional data from patients with NHL (red) and CLL (blue). The area of data overlap is purple.

(a) – % of lymphocytes; (b) – immunoregulatory index, CD4/CD8 ratio; (c) – percentage of CD3-HLA-DR.

На первом этапе применения методов ИНС были построены многомерные образы и выявлены различия при сопоставлении состояния здоровья с состоянием ХЛЛ и с состоянием НХЛ [1].

На втором этапе выявлена структуризация данных и определена возможность различения многомерных образов заболеваний НХЛ и ХЛЛ. Результаты анализа многообещающи. Многомерный анализ находит различия в выраженности нарушений иммунитета (CD3, CD4, CD8 и CD16) и уровня опухолевых клеток (HLA-DR, CD19, CD20, CD22, CD23 и % лимфоцитов), находящихся в крови, т.е. степень противостояния иммунитета росту опухоли при изучаемых патологиях различна: контрастность иммунитета и опухолевого роста при НХЛ и ХЛЛ очевидна. Она обусловлена 10 признаками из 13, контрастно описываемыми противодействие иммунитета и опухолевых клеток: при ХЛЛ процент иммунокомпетентных клеток значительно ниже, а опухолевых клеток выше, чем при НХЛ.

Поэтому процентное содержание лимфоцитов крови и уровень В-клеток (CD19, CD20, CD22, CD23, HLA-DR), выступают при кластеризации как признаки, контрастирующие происхождение, первичную локализацию и особенности опухолевого роста НХЛ и ХЛЛ. При ХЛЛ эти показатели существенно выше, чем при НХЛ. При ХЛЛ нарастают признаки опухолевой пролиферации за счет выхода в кровеносное русло активированных опухолевых со сниженным потенциалом гибели В-клеток, накапливающихся по мере развития процесса. Начальные же варианты ХЛЛ более похожи на моноклональный лимфоцитоз, проявляют низкую лейкомизацию, поэтому их многомерный образ может быть «заброшен» анализом на территорию кластера НХЛ.

В свою очередь, образ НХЛ из малых лимфоцитов в случае выраженного проявления лейкомизации, по своей многомерной структуре может быть схож с ХЛЛ из малых лимфоцитов; т.е. оказаться близким или аналогичным ХЛЛ и метод картирует его на территории, занимаемой кластером ХЛЛ. Это сходство находится в соответствии с классификацией лимфом зрелоклеточного происхождения, объединяющей ХЛЛ и НХЛ, опухолевым субстратом которых являются малые лимфоциты, в общей рубрике [4]. Мы полагаем, что за счет таких вариантов, а также других нозологий со сходными этапами патогенеза, обнаруживаются «забросы» между кластерами на «чужую» территорию, т.е. происходит перекрытие и «смазанность» границ между кластерами в многомерном пространстве.

Выход и накопление в крови опухолевых клеток отрицательно коррелирует с уровнем Т-лимфоцитов (CD3, общих Т-клеток, CD4+Т-хелперов, CD8+Т-кил-

леров) и CD16+НК-клеток, отражая снижение их относительного уровня в циркуляции. Важно, что проценты этих клеток по мере роста популяции опухолевых В-клеток в крови при ХЛЛ снижаются значительно, чем при НХЛ, что делает их величины пригодными для дифференциации состояний в качестве контрастирующих признаков. По ним (CD3, CD4, CD8 и CD16) пациенты с НХЛ обладают большими значениями, чем пациенты с ХЛЛ. Мы не будем в сравнительном аспекте обсуждать степень утраты иммунокомпетентности, т.к. это не входит в задачи данного исследования.

Таким образом, кластерная структура данных, выявленная методами ИНС при НХЛ и ХЛЛ, наглядно отражает особенности течения опухолевого процесса при этих видах зрелоклеточной лимфопротиферации и ее отражение в уровне показателей крови может быть использовано для построения автоматизированного алгоритма различения этих заболеваний.

Заключение и выводы

В настоящем исследовании изучена возможность и определены перспективы применения методов ИНС для различения вариантов зрелоклеточной В-клеточной лимфопротиферации (НХЛ и ХЛЛ) за счет оптимизации использования иммунограмм крови без необходимости использования клеток лимфатических узлов, костного мозга, других органов и тканей. В анализ включены данные клинико-иммунологического обследования 352 пациентов с В-клеточными НХЛ и 315 пациентов с ХЛЛ.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Подтверждена гипотеза о высокой эффективности применения технологии самоорганизующихся карт Кохонена (СОКК) для выявления структур в многомерных массивах экспериментальных данных больных НХЛ и ХЛЛ. Благодаря ее применению выявлена четкая двух кластерная структура в многомерных данных НХЛ и ХЛЛ.

2. Доказано однозначное соответствие кластерной структуры групповой структуре анализируемых данных: два кластера соответствуют распределениям пациентов двух групп анализируемых заболеваний, НХЛ и ХЛЛ.

3. Структуры данных ХЛЛ и НХЛ различаются по степени выхода опухолевых клеток в кровь (большей при ХЛЛ) и степени угнетения иммунитета (меньшей при НХЛ). Полученная интерпретация логична и не противоречит патофизиологии анализируемых состояний ХЛЛ и НХЛ.

4. Выдвинута гипотеза о том, что анализируемое множество данных может быть использовано для по-

строения высокоэффективной автоматической диагностической процедуры распознавания НХЛ и ХЛЛ. Важно, что при этом отпадает необходимость анализа показателей костного мозга, лимфоузлов и других тканей, что значительно облегчит процедуру диагностики анализируемых патологических состояний.

Литература

(п.п. 1-3; 6; 7; 9; 11; 16-18 см. References)

4. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. Под ред. Поддубной И.В., Савченко В.Г. М.: 2018.
5. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. М.: 2018.
8. Зиновьев А. Визуализация многомерных данных. Красноярск: 2000.
10. Тант Зин Пью, Тин Чжо, Пья Сон Ко Ко и Пайе Тэйн Наинга. Методика системы распознавания образов с помощью самоорганизующихся карт Кохонена нейронных сетей на основе *Matlab*. Интернет-журнал «Науковедение». 2013; 5.
12. Ярилин А.А. Иммунология. Учебник. М.: Гэотар-Медиа; 2010.
13. Неприна Г.С., Кузьмина Е.Г., Павлов В.В. и др. Иммунофенотипический анализ лимфоцитов костного мозга и периферической крови у больных В-клеточными злокачественными лимфомами. Медицинская иммунология. 2006; 8(2-3): 347-8.
14. Демидова И.А., Никитин Е.А. Молекулярные методы в онкогематологии. Гериатрическая гематология. М.: Медиум; 2011; 251-83.
15. Обухова Т.Н. Цитогенетика зрелоклеточных лимфатических опухолей. Гериатрическая гематология. М.: Медиум. 2011; 239-50.
19. Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. Клиническая онкогематология. 2012; 5 (2): 84-95.
20. Свирновский А. И. Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы. Медицинские новости. 2008; 13: 7-19.
- an Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018; 94: 121-8.
4. Poddubnaya I.V., Savchenko V.G. Russian recommendations for diagnosis and individual lymphoproliferative diseases. *Rossiyskiye rekomendatsii po diagnostike i otdel'nym limfoproliferativnym zabolevaniyam.* Moscow: 2018. (In Russian)
5. Kaprina A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. *Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevayemost' i smertnost')]*. Moscow MNI OI im. P.A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution «NMITsology» of the Ministry of Health of Russia. Moscow: 2018. (In Russian)
6. Kohonen T., Essentials of the self-organizing map. *Neural Networks.* 2013; (37): 52–65.
7. Dubravko Miljković. Brief Review of Self-Organizing Maps. *MIPRO.* May Opatija, Croatia. 2017; 22- 6.
8. Zinoviev A. *Preview of multivariate data. [Vizualizatsiya mnogomernykh dannykh]*. Krasnoyarsk: 2000. (In Russian)
9. Ji Zhang and Hai Fang. *Using Self-Organizing Maps to Visualize, Filter and Cluster*, in: *Applications of Self-Organizing Maps, chapter 9.* Ed., Magnus Johnsson. 2012.
10. Thant Zin Pyo, Tin Zhuo, Pya Son Ko Ko and Paye Thein Nainga. Methodology for a pattern recognition system using self-organizing Kohonen maps of neural networks based on Matlab. *Internet journal «Science».* 2013; 5.
11. Mathworks Inc., Self Organising Maps Toolbox, <https://www.mathworks.com>
12. Yarilin A.A. *Immunology. Textbook. [Immunologiya. Uchebnik]*. «Geotar-Media». 2010. (In Russian)
13. Neprina G.S., Kuzmina E.G., Pavlov V.V., et al. Immunophenotypic analysis of bone marrow and peripheral blood lymphocytes in patients with B-cell malignant lymphomas. *Meditsinskaya immunologiya.* 2006; 8(2-3): 347-8. (In Russian)
14. Demidova I.A., Nikitin E.A. Molecular methods in oncohematology. *Geriatricheskaya gematologiya.* Moscow: 2011: 251-83. (In Russian)
15. Obukhova T.N. Cytogenetics of mature cell lymphatic tumors. *Geriatricheskaya gematologiya.* Moscow: 2011: 239-50. (In Russian)
16. Kikushige Y., Ishikawa F., Miyamoto T., et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2011; 20: 246-59.
17. Rozman C., Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995; 333: 1052-7.
18. Scrivener S., Kaminski E.R., Demaine A., Prentice A.G. Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation. *British Journal of Haematology.* 2001; 4(112): 959–64. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02672
19. Kazansky D.B. T-lymphocytes in the development of chronic lymphocytic leukemia. Clinical oncohematology. Basic research and clinical practice. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2012; 5(2): 84-95. (In Russian)
20. Svirnovsky A.I. Chronic lymphocytic leukemia: paradigms and paradoxes. *Meditsinskiye novosti.* 2008; 13: 7-19. (In Russian)

References

1. Hallek M., Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol.* 2021; 96(12): 1679-705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>
2. Swerdlow S.H., Campo E., Pileri S.A., et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016; 19; 127(20): 2375–90. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569
3. Cree I.A., Tumours A.C., Kreuzer K.A., Soosapilla A., et al. The WHO Classification of Haematolymphoid, Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an Europe-

Сведения об авторах:

Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП, e-mail: saburina@mail.ru;

Кузьмина Евгения Геннадьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отд-ния клинической иммунологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;

Черкашенко Владимир Николаевич, науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

Павлов Вячеслав Владимирович, канд. мед. наук, врач-гематолог отд-ния лучевой и лекарственной терапии гемобластозов МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;

Зацаренко Светлана Валерьевна, науч. сотр. клинической иммунологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;

Антонов Кирилл Николаевич, студент факультета вычислительной математики и кибернетики (ВМК) ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

Богданенко Елена Валентиновна, ст. науч. сотр. лаб., клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

Устинова Екатерина Евгеньевна, мл. науч. сотр., лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП;

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

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092

Гераськин И.В.¹, Дерюгина А.В.¹, Гераськина Н.В.², Гераськин В.А.³**Влияние возрастных изменений состава физиологических гемоглобинов и кислородного баланса крови на формирование реактивности организма в неонатальном периоде**¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603022, Нижний Новгород, Россия, пр. Гагарина, д. 23;²Нижегородская областная детская клиническая больница, 603136, Нижний Новгород, Россия, ул. Ванеева, д. 211;³ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», 603000, Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

Сопоставление отдельных наблюдений в области транспорта кислорода, его доставки в ткани с учетом возрастных периодов развития ребенка – способствует более детальному изучению особенностей формирования реактивности.

Цель исследования – определить направленность формирования реактивности организма при увеличении окислительного потенциала у детей, обусловленного динамикой состава гемоглобинов и переходом на легочный тип газообмена.

Методика. Данные исследований получены при ретроспективном анализе медицинской документации этапов лечебно-диагностического процесса в отделениях неонатологии и интенсивной терапии новорожденных. Использован метод случайной выборки зафиксированных клинических показателей кислородного статуса пациентов. Структура исследований содержит клинические данные 208 пациентов неонатологического и педиатрического профиля. Проанализировано 582 показателей физиологических гемоглобинов крови: фетального гемоглобина – HbF, взрослого варианта гемоглобина – HbA. В группах пациентов отделений неонатологии выполнены сравнения динамики физиологических гемоглобинов крови: HbF и HbA, концентрации гемоглобина – ctHb (г/л), уровней сродства гемоглобина крови к кислороду – p50 mmHg, общего содержания кислорода в капиллярной крови – ctO₂, кислородной емкости крови – КЕК. Для определения величин параметров оксиметрии и газов крови использовали стационарный, автоматический анализатор Radiometer ABL 800 basic. Результаты данных пациентов систематизированы по группам, в зависимости от возрастных интервалов.

Результаты. Для изучения особенностей становления реактивности у детей первых месяцев жизни мы проанализировали 582 информационных блока (по данным историй болезни), отражающих динамику снижения показателей плодного гемоглобина. В ходе анализа данных определено, что парциальное давление кислорода – p50(mmHg), необходимое для 50% насыщения крови в неонатальном периоде имеет возрастную устойчивую тенденцию к росту и достигает величины 25,1 mmHg, что свидетельствует о уменьшении сродства гемоглобина к кислороду. Кислородная емкость крови – будучи производной величиной от ctHb, уменьшается к 3 мес жизни на 4,39 мл кислорода в каждом децилитре крови. Общее содержание кислорода в капиллярной крови – ctO₂ (к) достигает к завершению неонатального периода минимального уровня 12,46 (Vol%).

Заключение. Способность новорожденных и детей раннего возраста адекватно реагировать на усиление влияния факторов оксигенации внешней и внутренней среды определяется сочетанием специфических реакций организма, обусловленных реализацией индивидуальными онтогенетическими программ по нейтрализации избыточного воздействия кислорода.

Ключевые слова: реактивность; гемоглобин; кислород; физиологические; онтогенез

Для цитирования: Гераськин И.В., Дерюгина А.В., Гераськина Н.В., Гераськин В.А. Влияние возрастных изменений состава физиологических гемоглобинов и кислородного баланса крови на формирование реактивности организма в неонатальном периоде. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 81-88.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.81-88

Для корреспонденции: Гераськин Иван Владимирович, ivan_geraskin19@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гераськин И.В.; сбор и обработка материала – Гераськин И.В., Гераськина Н.В.; подготовка иллюстративного материала – Гераськин В.А.; статистическая обработка материала – Гераськин И.В.; написание текста – Гераськин И.В., Гераськина Н.В., Дерюгина А.В.; редактирование – Гераськин В.А., Дерюгина А.В.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.09.2023

Принята в печать 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Geraskin I.V.¹, Deryugina A.V.¹, Geraskina N.V.², Geraskin V.A.³

The effect of age-related changes in the composition of physiological hemoglobins and blood oxygen balance on the formation of reactivity of the body in the neonatal period

¹Lobachevsky Nizhny Novgorod State University,
23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603022, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital,
211 Vaneeva St., Nizhny Novgorod, 603136, Russian Federation;

³Privolzhsky Research Medical University,
10/1 Ploshchad Minina i Pozharskogo, Nizhny Novgorod, 603000, Russian Federation

The comparison of individual observations in the field of oxygen transport and delivery to tissues with consideration of the child's age-related development provides a better insight into the formation of reactivity.

The aim of the study was to determine the direction of the reactivity formation in children as the oxidative potential increases due to changes in the hemoglobin composition and the transition to the pulmonary type of gas exchange.

Methods. The data were obtained by a retrospective analysis of medical records of the stages in the therapeutic and diagnostic process in neonatology and neonatal intensive care units. The method of random sampling of the recorded clinical indicators for the oxygen status was used. The study structure contains clinical data of 208 neonatological and pediatric patients. 582 indicators of physiological blood hemoglobins were analyzed, including fetal hemoglobin (HbF) and adult hemoglobin (HbA) variants. In groups of patients of neonatological departments, the dynamics of structural hemoglobins (HbF and HbA), hemoglobin concentrations (ctHb, g/l), hemoglobin-oxygen affinities (p50 mmHg), total oxygen content in capillary blood (ctO₂), and oxygen binding capacity (OBC) of blood were compared. To determine the values of oximetric parameters and blood gases, a Radiometer ABL 800 basic analyzer was used. The results were grouped based on patients' age intervals.

Results. To study the formation of reactivity in children during the first months of life, we analyzed 582 information blocks (according to case reports) that reflected the dynamics of decreases in fetal hemoglobin. The data analysis determined that the partial oxygen pressure, p50 (mmHg), required for a 50% blood saturation during the neonatal period has an age-related steady upward trend and reaches a value of 25.1 mmHg, which indicates a decrease in the hemoglobin-oxygen affinity. Blood oxygen capacity, being a derivative of ctHb, decreases by 4.39 ml of oxygen per deciliter of blood by the 3rd month of life. The total oxygen content in capillary blood, ctO₂(c), reaches the lowest level of 12.46 (Vol%) by the end of the neonatal period.

Conclusion. The ability of newborns and infants to adequately respond to the increasing influence of oxygenation factors from the external and internal environment is determined by a combination of specific reactions of the body due to the implementation of individual ontogenetic programs to neutralize an excess oxygen exposure.

Keywords: reactivity; hemoglobin; oxygen; physiological; ontogenesis

For citation: Geraskin I.V., Deryugina A.V., Geraskina N.V., Geraskin V.A. The effect of age-related changes in the composition of physiological hemoglobins and blood oxygen balance on the formation of reactivity of the body in the neonatal period. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 81-88. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.81-88

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

For correspondence: *Ivan V. Geraskin ivan*, postgraduate student – department of physiology and anatomy; place of work – doctor; Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, e-mail: ivan_geraskin19@mail.ru

Information about the authors:

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

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

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 18.09.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Актуальность выполненных исследований определяется необходимостью своевременного выявления изменений свойств организма новорожденных и детей раннего возраста, отвечать изменениями жизнедеятельности на воздействия факторов окружающей среды [1, 2].

Физиологические и патологические процессы, формирующиеся в перинатальном периоде развития, характеризуются чертами, несвойственными иным возрастным периодам. Распространено мнение, что любой детский организм менее устойчив, чем организм взрослого к разнообразным воздействиям среды, влияющих на его гомеостаз [3].

Вместе с тем, следует отметить, что ни один организм взрослого человека, в отличие от организма новорожденного, не испытывает одновременного множественного влияния постоянно изменяющихся физиологических факторов среды, интенсивно воздействующих на основы жизнедеятельности. Путем совершенствования регуляции ответных реакций – организм ребенка в краткое время адаптируется к изменяющимся условиям послеродового периода: смена типа газообмена и уровня окислительных процессов, переход на энтеральный тип питания и новый тип кровообращения (прекращается плодный тип кровообращения), изменение типа гемопоэза и структуры гемоглобина крови. По направленности, скорости развития и амплитуде происходящих процессов, реактивность у новорожденных можно охарактеризовать не как форму возрастной выраженной нестабильности, а как состояние динамического равновесия. До настоящего времени вопросам формирования реактивности у пациентов неонатального периода уделяется недостаточно внимания, объем исследований и количество публикаций крайне ограниченное. Сопоставление отдельных наблюдений в области транспорта кислорода, его доставки в ткани с учетом возрастных периодов развития ребенка способствует более детальному изучению особенностей формирования реактивности.

Цель исследования: определить влияние возрастных изменений состава физиологических гемоглобинов крови и динамики кислородного баланса неонатального периода на формирование реактивности организма.

Методика

При ретроспективном анализе данных медицинской документации в отделениях неонатологии и интенсивной терапии новорожденных получены данные

исследований, проведенных на этапах лечебно-диагностического процесса. В ходе исследований использован метод случайной выборки зафиксированных клинических показателей пациентов [4].

В группах пациентов неонатологических отделений выполнены сравнения динамики физиологических гемоглобинов крови и уровней сродства гемоглобина крови к кислороду $p50$ mmHg. В анализ включены данные пациентов без предшествующих гемотрансфузий. Структура исследований содержит клинические данные 208 пациентов неонатологического и педиатрического профиля. Проанализировано 582 показателей физиологических гемоглобинов крови. Для определения величин параметров оксиметрии и газов крови использовали стационарный, автоматический анализатор Radiometer ABL 800 basic. Исследованы величины показателей гемоглобинов крови: 1). фракции гемоглобина взрослого типа – HbA; 2). фракции фетального гемоглобина – HbF. Полученные результаты данных пациентов распределены на группы, в зависимости от возрастных интервалов: 1). 0-1 неделя 2). 1-2 неделя 3). 2-3 неделя 4). 3-4 неделя 5). 1-2 мес. 6). 2-3 мес. Массив данных по динамике значений HbF (%) и сродства гемоглобина крови к кислороду $p50$ (mmHg) в группах сравнения составлен по результатам клинических обследований пациентов неонатального профиля. Морфологические изменения учитывались по данным аутопсий.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась при помощи прикладного программного ресурса «Анализ данных», использован пакет программ Microsoft Excel – 2010 и программ Medstatistic для статистического анализа. Параметрический t-критерий Стьюдента был использован для сравнения выборок. Сравнение показателей средних величин (M) осуществляли при анализе несвязанных между собой вариационных рядов. Учитывали значения ошибок средних арифметических (m). За критический уровень статистической значимости различий средних величин (p) принимали значения $p < 0,05$. Распределение признаков соответствует нормальному – распределение Гаусса [5].

Результаты

Амплитуда колебаний средних величин физиологических гемоглобинов крови наиболее выражена в период новорожденности и первых месяцев жизни. В терапевтической практике возрастной интервал у пациента продолжительностью 3-5 лет не имеет определяющего значения в специфике смены физиологических величин исследуемых показателей [6]. Физиологические значения HbA и HbF у 20 летнего пациента аналогичны таковым

у 26 летнего. Скорости образования и разрушения гемоглобинов у взрослых пациентов уравновешены, состав и физиологические параметры гемоглобинов статичны, амплитуда величин постоянная, фетальный гемоглобин отсутствует или составляет величину <1%. Соответственно у взрослых процессы транспорта кислорода, оксигенации тканей – количественно фиксированы и отличаются малым диапазоном для действия адаптивных реакций, реализуемых посредством HbA и HbF [7, 8]. Для изучения особенностей становления реактивности у детей первых месяцев жизни мы проанализировали (по данным историй болезни), n=582, динамику показателей плодного гемоглобина в соотношении с HbA.

В представленном графике (рис. 1) содержатся данные, свидетельствующие о динамике снижения ctHb g/dL (более, чем на 25% в сравнении с уровнем при рождении) к 3 месяцу жизни. Учитывая, что 1 г гемоглобина может связать 1,34 мл кислорода (константа Гюфнера) проведено определение кислородной емкости крови – КЕК [9].

Выполненный анализ позволяет определить, что КЕК – будучи производной величиной от ctHb, уменьшается к 3 месяцу жизни на 3,63 мл кислорода в каждом децилитре крови. Параллельно, в этот же возрастной период фиксируется прогрессивное снижение содержания количества HbF в структуре общего гемоглобина крови (см. табл.). Что, учитывая физио-

логические свойства плодного гемоглобина и уменьшение доли HbF в структуре общего гемоглобина, снижает доставку кислорода в ткани и степень их оксигенации. Происходит изменение реактивности организма – его способности к ответу на влияние условий внешней и внутренней среды.

Индивидуальные механизмы реактивности и границы их функционирования чрезвычайно вариабельны. В этой ситуации усиливается суммирующий эффект влияния факторов. Широкий диапазон изменений признаков способствует более быстрому формированию адекватных адаптивных реакций и создает возможности для лучшего приспособления к меняющимся условиям. Наличие большего количества вариантов и соотношений предопределяет возможность наиболее качественного и своевременного выбора формы ответной реакции. Реализуется закон диалектики, сформулированный при интерпретации логики Г. Гегеля. Закон перехода количества в качество – развитие осуществляется путём накопления количественных изменений в структуре, что приводит к выходу за пределы значений нормы и скачкообразному переходу к новому качеству [10].

Формируется преобразование незначительных, низкоамплитудных количественных показателей в новое качественное состояние – изменения явные и основные, базисные.

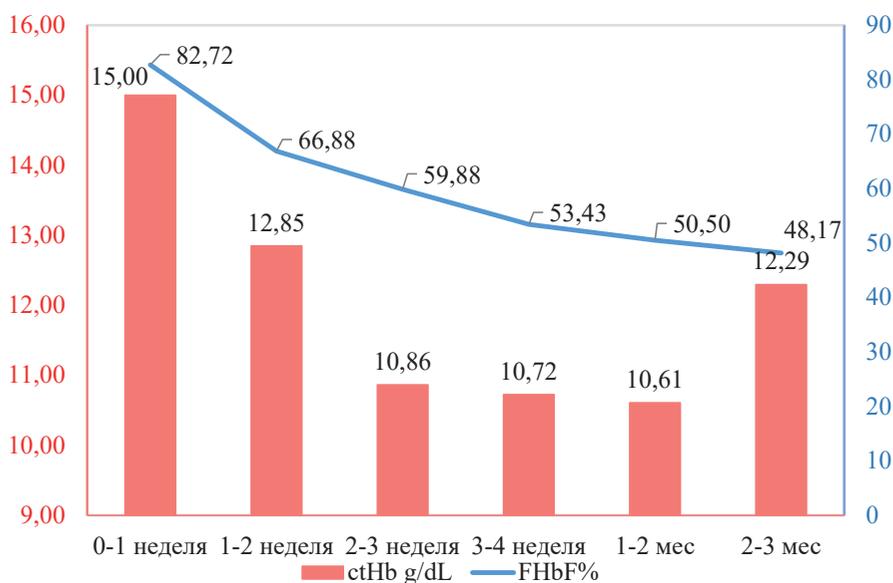


Рис. 1. Динамика средних значений (M) показателей HbF%, ctHb g/dL у новорожденных и детей в первые три месяца жизни (n=582); p<0,05.

Fig. 1. Dynamics of average values (M) of HbF%, ctHb g/dL in newborns and children in the first three months of life (n=582); p<0,05.

В представленном графике (рис. 2) содержатся данные, свидетельствующие о динамике снижения HbF% и зависимо от него сродства гемоглобина к кислороду – P50 (mmHg). Результаты получены на основании анализа динамики показателей историй болезней в группе детей первых трех месяцев жизни. По параметру P50 (mmHg) оценивали сродство гемоглобина к кислороду в обследованной группе ($n=286$). В ходе анализа данных определено, что парциальное давление кислорода p50(mmHg), необходимое для 50% насыщения крови имеет устойчивую тенденцию к повышению и достигает величины 25,1 mmHg, что обуславливает снижение сродства общего гемоглобина к кислороду. Механизм насыщения крови кислородом и доставки его в ткани, по мере взросления у новорожденных и детей первых месяцев жизни, становится все более затратным. Данная тенденция происходит на фоне изменения состава физиологических гемоглобинов крови в сторону уменьшения содержания FНbF% с более высоким сродством к кислороду чем у гемоглобина взрослого типа – FНbА. Для сравнения приводим график динамики замещения гемоглобинов (рис. 3), составленный с использованием данных L. Luchtman-Jones и соавт. [11].

По завершению первых месяцев жизни формируется устойчивая, стабильная гемическая структура транс-

портирующая кислород в ткани и определяющая его диссоциацию, преимущественно за счет HbА – характерная для взрослых и детей старших возрастных групп.

Направленность событий у новорожденных и детей раннего возраста, стремительное повышение окислительного потенциала в момент рождения, при переходе организма на легочный газообмен – создает условия для последующего гипероксического повреждения тканей [12, 13]. В качестве ответной меры на увеличение окислительного потенциала (переход на легочный газообмен при рождении) в неонатальном периоде происходит динамичное снижение активности оксигенации, о чем свидетельствует быстрое уменьшение амплитуды исследуемых факторов в первые дни и недели жизни. Устанавливаются качественно новые критерии реактивности организма, базирующиеся на смене кислородного статуса организма (рис. 4).

В то же время, в период новорожденности начинают реализовываться типовые процессы: ранняя и поздняя анемия новорожденных, гемолиз и физиологическая желтуха. Уменьшаются количественные гематологические показатели, характеризующие транспорт кислорода ctHb(g/dL), ctO2(Vol%). Возрастает величина P50 (mmHg), что свидетельствует о необходимости большего парциального давления кислорода для 50% насыще-

Формирование КЕК в зависимости от структуры гемоглобина и возраста ребенка ($n=582$); $p<0,05$

Formation of cupcakes depending on the structure of hemoglobin and the age of the child ($n=582$); $p<0,05$

Возраст	0-1 неделя	1-2 неделя	2-3 неделя	3-4 неделя	1-2 мес	2-3 мес
HbF%	82,72 ±6,22	66,88 ±4,69	59,88 ±4,80	53,43 ±5,17	50,5 ±6,56	48,17 ±8,09
HbА%	17,28 ±6,22	33,12 ±4,69	40,12 ±4,80	46,57 ±5,17	49,5 ±6,56	51,83 ±8,09
КЕК	20,1 ±0,60	17,21 ±0,70	14,56 ±0,70	14,37 ±0,74	14,21 ±0,49	16,47 ±1,73

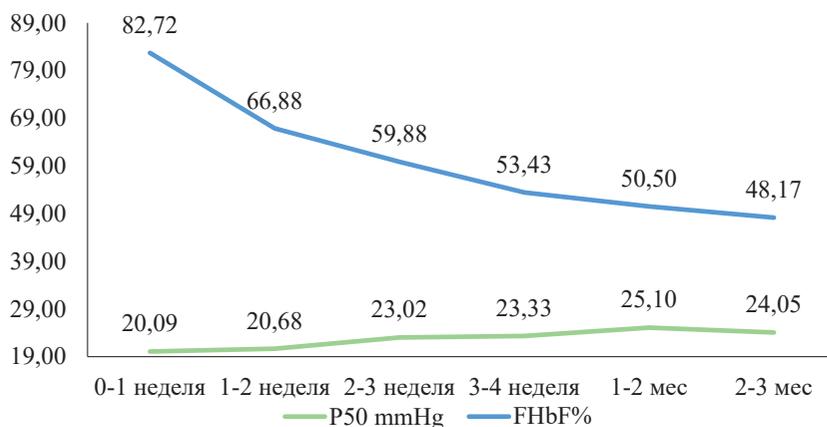


Рис. 2. Динамика средних значений (M) показателей HbF%, P50 (mmHg) у новорожденных и детей в первые три месяца жизни ($n=286$), $p<0,05$.

Fig. 2. Dynamics of average values (M) of HbF%, P50 (mmHg) in newborns and children in the first three months of life ($n=286$); $p<0,05$.

ния гемоглобина, влияя на динамику уменьшения гипоксии [14]. Перечисленные изменения, в качестве ответной реакции организма, позволяют адаптироваться к быстрому росту содержания кислорода в крови после рождения. Вместе с тем, не все показатели газов крови отражают стабильную, узконаправленную реакцию при гипероксии [15]. Парциальное давление кислорода в крови pO_2 и сатурация крови sO_2 (sO_2 определяется как отношение между концентрацией O_2Hb и $Hb+O_2Hb$) – отражают активность поглощения кислорода в легких и последующее насыщение крови кислородом, являются показателями кратковременной экстренной адаптации. Они не формируют стабильной достоверной закономерности с другими величинами реактивности в первые месяцы жизни ребенка.

Перинатальный и неонатальный периоды характеризуются сменой типа гемопоэза. В эти периоды развития формируется депрессия очагов экстре-

дулярного эритропоэза при активации костномозгового кроветворения [16]. Для определения морфологических свойств эритроцитов и состава гемоглобинов, плодного и взрослого типа, использованы мазки крови, обработанные в ходе лечебно-диагностического процесса и гистологические срезы, приготовленные из аутопсийного материала. Осуществляли диагностику динамики замещения эритроцитов с плодным гемоглобином на эритроциты, содержащие HbA , для чего разработали и применили методику поляризационно-интерференционной микроскопии с определением оптической плотности и меры светопропускания в эритроцитах и тканях. Методика с применением поляризационно-интерференционной микроскопии PZO BIOLAR PI с микрофотометрической насадкой UPI способствовала изучению оптических свойств и меры светопропускания в отдельных эритроцитах, в зависимости от наличия плодного гемоглобина [17].

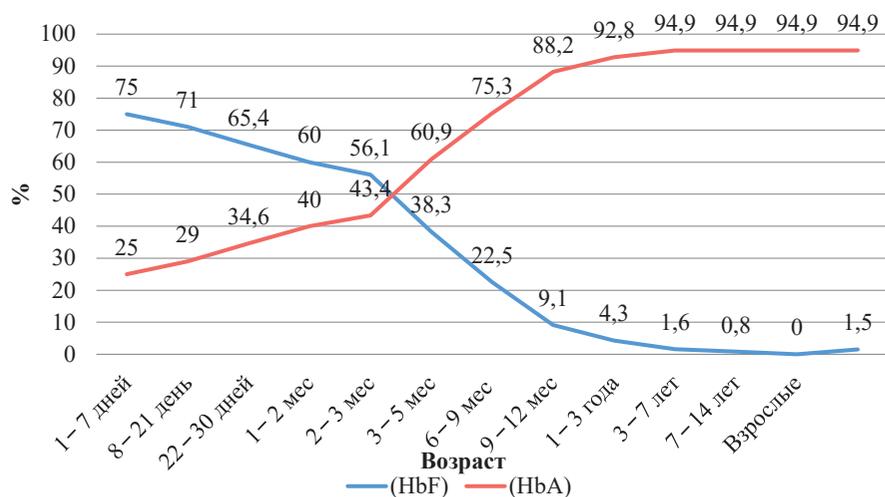


Рис. 3. Динамика замещения фракций гемоглобинов у детей в первые недели и месяцы жизни. (По данным L. Luchtman-Jones и соавт. 2002).

Fig. 3. Dynamics of replacement of hemoglobin fractions in children in the first weeks and months of life. (According to L. Luchtman-Jones et al. 2002).

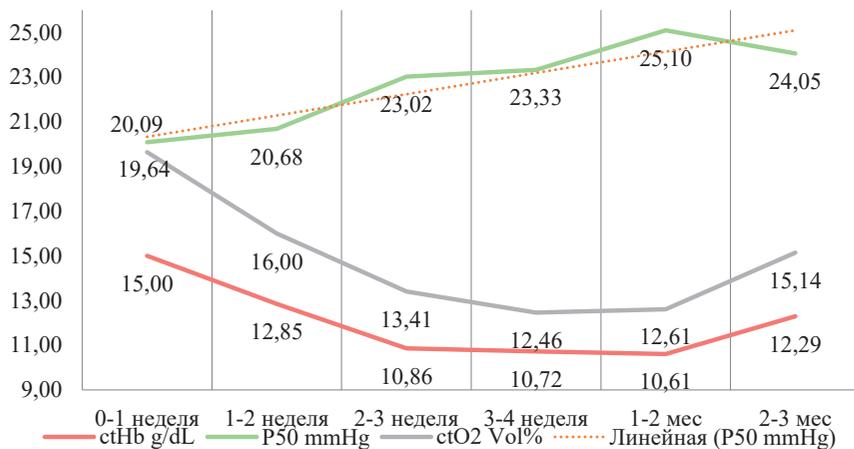


Рис. 4. Динамика средних значений (M) показателей $ctHb$ (g/dL), $P50$ (mmHg), ctO_2 (Vol%) у новорожденных и детей в первые три месяца жизни ($n=582$); $p<0,05$

Fig. 4. Dynamics of average values (M) of $ctHb$ (g/dL), $P50$ (mmHg), co_2 (Vol%) in newborns and children in the first three months of life ($n=582$); $p<0.05$

Констатировали, что в очагах гемопоэза и эритроцитах новорожденных сохраняется устойчивая тенденция к снижению содержания плодного гемоглобина.

Исследуемые образцы содержали фрагменты ткани печени с дискретно расположенными островками экстрамедуллярного гемопоэза. Эритробласты представлены мноморфными клетками с округлыми, гиперхромными ядрами и скудной бледно – эозинофильной цитоплазмой. В гемопоэтических клетках отмечено высокое ядерно-цитоплазматическое отношение (норм. величины N/C: до 4:1) [18].

В образцах «В» отмечается уменьшение количество очагов экстрамедуллярного кроветворения в сравнении с образцами «А», что свидетельствует о снижении их гемопоэтической активности – по мере увеличения гестационного возраста (рис. 5).

Выполнено определение показателей светопропускания и оптической плотности эритроцитов в клетках островков гемопоэза печени. По результатам морфологических исследований следует отметить, что помимо снижения общей гемопоэтической активности, происходящие изменения перестраивают структуру синтезируемого гемоглобина.

Заключение

Выявленные изменения характеризуются структурной нестабильностью и высокой динамичностью показателей гемоглобинов по мере увеличения возраста. Прогрессивное снижение количества фетального гемоглобина крови, имеющего большее сред-

ство к кислороду, чем у НБА, способствует уменьшению степени выраженности окислительного стресса [19–21].

Способность новорожденных и детей раннего возраста адекватно реагировать на изменяющиеся факторы оксигенации внешней и внутренней среды определяется сочетанием специфических реакций организма, обусловленных реализацией индивидуальных онтогенетических программ по ликвидации избыточного воздействия кислорода. Причем, в неонатальном периоде задействован широкий, многокомпонентный, доступный индивиду диапазон ответов на переход организма при рождении с плацентарного на легочный газообмен с быстрым увеличением содержания кислорода в крови. Активируются адаптивные реакции, направленные на нивелирование окислительного стресса: снижение количества транспорта кислорода – эритропения, уменьшение фракции плодного гемоглобина, снижение сродства общего гемоглобина и его отдельных фракций к кислороду. Параллельно перестраиваются морфологические структуры, снижается активность гемопоэза, уменьшается количество гемопоэтических клеток, происходит инволюция экстрамедуллярных кроветворных островков. Реактивность, формирующаяся у новорожденных, по количеству задействованных и доступных организму адаптивных ответов, динамизму активации наследованных программ и реакций, связанных с особенностями онтогенеза, масштабу метаболической и морфологической вовлеченности организма является явлением уникальным, не характерным для любого другого периода жизни.

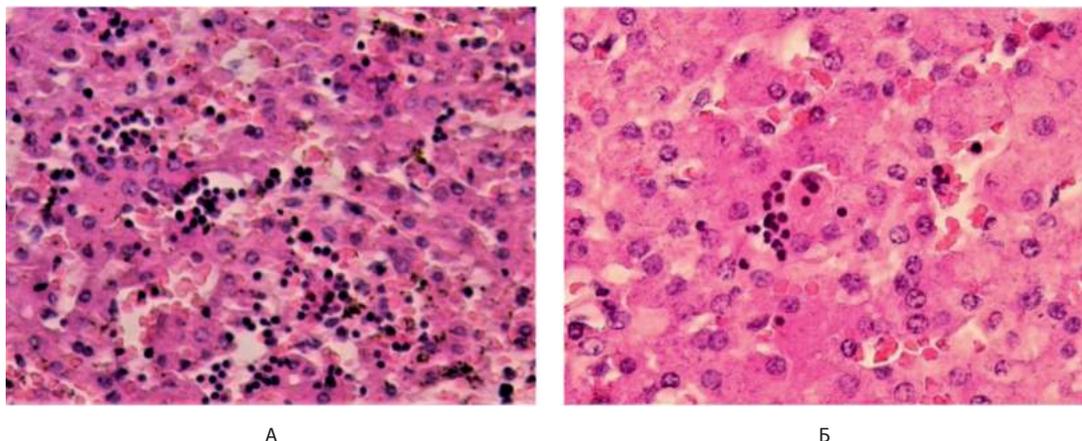


Рис. 5. Световая микроскопия активности экстрамедуллярных очагов гемопоэза в тканях печени новорожденного: А) по материалам аутопсии, 2 суток жизни, при сроке гестации 29 недель (масса тела 1440 г); В) по материалам аутопсии, 3 суток жизни, при сроке гестации 40 недель (масса тела 3150 г); Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Fig. 5. Light microscopy of the activity of extramedullary foci of hematopoiesis in the liver tissues of a newborn: A) according to autopsy materials, 2 days of life, with a gestation period of 29 weeks (body weight 1440 gr.); B) according to autopsy materials, 3 days of life, with a gestation period of 40 weeks (body weight 3150 gr.); Stained with hematoxylin and eosin. $\times 400$.

Литература

(п.п. 8; 11-14; 16-19 см. References)

1. Деворова М.Б., Шайхова М.И. Влияние реактивности организма на клинические формы респираторной аллергии у детей. *Врач-аспирант*. 2014; 1(1): 255–9. <https://inlibrary.uz/index.php/archive/article/view/19309>
2. Гуцол Л.О., Непомнящих С.Ф. Особенности течения патологических процессов в ранний период онтогенеза. ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Иркутск. 2014; 133–7.
3. Биркун А.А., Власюк В.В., Гуревич П.С. *Патологическая анатомия болезней плода и ребенка. РуП20 руководство для врачей в 2 т.* М.: 1989; 384–7.
4. Матвеев В.А. *Статистика: Учебно-методическое пособие*. Нижний Новгород: 2015.
5. Полякова В.В., Шаброва Н.В. *Основы теории статистики*. М-во образования и науки Рос. Федерации, Екатеринбург. 2015: 148–62.
6. Зайчик А. Ш., Чурилов Л. П. *Основы общей патологии. Часть 1. Основы общей патофизиологии*. СПб.: 1999; 624–71. ISBN 5-7733-0060-5
7. Шапошникова Н.Ф., Деларю Н.В., Заячникова Т.Е., Давыдова А.Н. *Особенности наблюдения за недоношенными детьми на амбулаторном этапе*. М.: 2020; 76–8.
9. Смирнов В.П. Копылова С.В. *Кровообращение: Учебное пособие*. Нижний Новгород. Нижегородский госуниверситет. 2016; 253–23;
10. Спиркин А.Г. *Философия*. 2-е изд. М.: Гардарики, 2006.
15. Рогаткин Д.А. Физические основы оптической оксиметрии. *Медицинская физика*. 2012; 2(54): 114–97. 104 – EDN OZLXTR.
20. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Левченкова О.С. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2015; 14(2): 74–16.
21. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменениям уровня кислорода. *Российский физиологический журнал*. 2005; 91(6): 636–55. PMID: 16119444
4. Matveev V.A. *Statistics: An educational and methodological guide. [Statistika: Uchebno-metodicheskoe posobie]*. Nizhniy Novgorod: 2015.
5. Polyakova V.V., Shabrova N.V. *Fundamentals of the theory of statistics. [Osnovy teorii statistiki]*. The Ministry of Education and Science grew. Federation, Yekaterinburg. 2015: 148–62.
6. Zaichik A. Sh., Churilov L. P. *Fundamentals of general pathology. [Osnovy teorii statistiki]*. Part 1. Fundamentals of general pathophysiology. St. Petersburg, 1999: 624–71. ISBN 5-7733-0060-5
7. Shaposhnikova N.F., Delarue N.V., Zayachnikova T.E., Davydova A.N. *Features of monitoring premature infants at the outpatient stage. [Osobennosti nablyudenie za nedonoshennymi det'mi na ambulatornom etape]*. Moscow; 2020: 76–8.
8. Ogawa M., Porter P.N. Fetal hemoglobin biosynthesis in clonal cell culture. *Tex Rep Biol Med*. 1981; 65-55. PMID: 6172874
9. Smirnov V.P. Kopylova S.V. *Blood circulation: A textbook. [Krovoobrashchenie: Uchebnoe posobie]*. Nizhniy Novgorod. Nizhny Novgorod State University. 2016: 253-23.
10. Spirkin A.G. *Philosophy. [Filosofiya]*. 2nd ed. Moscow: Gardariki, 2006; (In Russian).
11. Luchtman-Jones L., Schwartz A.L., Wilson D.B., Fanaroff A.A., Martin R.J. *The blood and hematopoietic system*. In: Neonatal-perinatal medicine. Disorders of fetus and infant. 2002: 1182-254.
12. Duranti G. Oxidative Stress and Skeletal Muscle Function. *International journal of molecular sciences*. 2023; 24(12). doi: 10.3390/ijms241210227
13. Zhao B., Zhu L., Ye M., Lou X., Mou Q., Hu Y., et al. Oxidative stress and epigenetics in ocular vascular aging: an updated review. 2023; 29(1); 28. doi: 10.1186/s10020-023-00624-7. PMID: 36849907; PMCID: PMC9972630.
14. Böning D., Kuebler W.M., Vogel D., Bloch W. The oxygen dissociation curve of blood in COVID-19-An update. 2023; doi: 10.3389/fmed.2023.1098547. PMID: 36923010; PMCID: PMC10008909.
15. Rogatkin D.A. *Physical foundations of optical oximetry. Meditsinskaya fizika*. 2012; 2(54): 114–97. 104 – EDN OZLXTR
16. Carles D., André G., Pelluard F., Martin O., Sauvestre F. Pathological Findings in Feto-maternal Hemorrhage. *Pediatr Dev Pathol*. 2014; 102-6. doi: 10.2350/13-12-1419-OA.1. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24575782
17. Grudziadzkie Z.G. «PZO BIOLAR Polarization interference microscope» Polish Optical Factories, WKC Warszawa 1976; 99-70
18. Hagerstwon, MD: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN0-7817-5007-5.
19. Bernardo V.S., Torres F.F., da Silva D.G.H. Fox O3 and oxidative stress: a multifaceted role in cellular adaptation. *Journal of Molecular Medicine*. 2023; 101(1-2): 99–83.
20. Pozhilova E.V., Novikov V.E., Levchenkova O.S. *Reactive oxygen species in cell physiology and pathology. Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj meditsinskoy akademii*. 2015; 14(2): 74–16.
21. Sazontova T. G., Arkhipenko Yu.V. *The role of free radical processes and redox signaling in the body's adaptation to changes in oxygen levels. Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal*. 2005; 91(6): 636–55.

References

Сведения об авторах:

Гераськин Иван Владимирович, аспирант, каф. физиологии и анатомии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского; врач, Нижегородская областная детская клиническая больница;
Дерюгина Анна Вячеславовна, доктор биол. наук, доцент каф. физиологии и анатомии; зав. каф., Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;
Гераськина Наталья Валентиновна, врач—неонатолог, ГБУЗ НО «Нижегородская областная детская клиническая больница»;
Гераськин Владимир Анатольевич, канд. мед. наук, доцент каф. Анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет».

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092; 615-053.2

Синюкова Т.А., Мордовина И.И., Коваленко Л.В., Белоцерковцева Л.Д.

Влияние фетоплацентарной недостаточности у беременных женщин при внутриутробном инфицировании на состояние здоровья новорожденных и детей раннего возраста

БУ ВО «Сургутский государственный университет»,
628412, Сургут, Россия, пр. Ленина, д. 1

Цель работы – изучить влияние фетоплацентарной недостаточности у беременных женщин на фоне внутриутробного инфицирования на состояние новорожденных и частоту выявления заболеваний различных органов и систем у детей раннего возраста (до трех лет).

Методика. Проведено морфологическое и гистологическое исследование последов у 205 беременных женщин высокой группы инфекционного риска. Оценивали наличие признаков восходящего, гематогенного и смешанного инфицирования последа, а также признаки острой и хронической плацентарной недостаточности. В первом и втором триместрах беременности в сыворотке крови женщин методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию кортизола, интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-10 (ИЛ-10). Проводили анализ историй новорожденных с целью изучения частоты встречаемости заболеваний или состояний. Риски неонатальной патологии рассчитывали по методике Глуховца Б.И. Частоту выявления заболеваний различных органов и систем у детей до 3 лет устанавливали на основании анализа данных учетных форм № 025/у (медицинская карта пациента, получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях).

Результаты. В группах с восходящим, гематогенным и смешанным инфицированием уровень кортизола в 1 триместре беременности был статистически значимо выше относительно группы контроля ($p < 0,05$). Высокие показатели кортизола в этих же группах сохранялись и во II триместре беременности. Концентрация ИЛ-10 в группах с восходящим и гематогенным инфицированием в сроке 11-12 недель беременности статистически значимо снижена. Обнаружена обратная корреляционная связь между уровнем кортизола и уровнем ИЛ-10 при восходящем и гематогенном инфицировании. У женщин с признаками инфицирования последа чаще встречались незрелые промежуточные ворсины, которые свидетельствуют о нарушении созревания плаценты. При восходящем инфицировании последа статистически значимо чаще развивалась хроническая компенсированная недостаточность, а при смешанном инфицировании – в стадии субкомпенсации. Гипотрофия плода статистически значимо чаще встречалась при гематогенном инфицировании. Частота выявления анализируемых групп заболеваний у детей при внутриутробном инфицировании была статистически значимо выше в сравнении с контролем.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о нарушении формирования фетоплацентарного комплекса при восходящем, гематогенном и смешанном путях инфицирования в связи с активацией продукции кортизола и снижении концентрации ИЛ-10 в начале гестации. Формирование ранней фетоплацентарной недостаточности на фоне внутриутробного инфицирования плода является дополнительным фактором риска для здоровья новорожденных и детей первых лет жизни и требует тщательного наблюдения за состоянием их здоровья.

Ключевые слова: внутриутробное инфицирование; фетоплацентарная система; кортизол; ИЛ-6; ИЛ-10; состояние новорожденных; заболевания детей раннего возраста

Для цитирования: Синюкова Т.А., Мордовина И.И., Коваленко Л.В., Белоцерковцева Л.Д. Влияние фетоплацентарной недостаточности у беременных женщин при внутриутробном инфицировании на состояние здоровья новорожденных и детей раннего возраста. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 89-97.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.89-97

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Коваленко Л.В.; сбор и обработка первичных данных, статистический анализ, построение таблиц и графиков, написание текста статьи Синюкова Т.А.; сбор и обработка первичных данных, статистический анализ – Мордовина И.И.; материальная база, редактирование статьи – Белоцерковцева Л.Д. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Синюкова Татьяна Александровна, e-mail: proles@bk.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Sinyukova T.A., Mordovina I.I., Kovalenko L.V., Belotserkovtseva L.D.

The effect of fetoplacental insufficiency in pregnant women with intrauterine infection on the health of newborns and young children

Surgut State University,
1 Lenin Ave., Surgut, 628412, Russian Federation

The aim of the work is to study the effect of fetoplacental insufficiency in pregnant women against the background of intrauterine infection on the condition of newborns and the frequency of detection of diseases of various organs and systems in young children (up to three years old).

Methods. Morphological and histological examination of the afterbirth was performed in 205 pregnant women of a high infectious risk group. The presence of signs of ascending, hematogenous and mixed infection of the afterbirth, as well as signs of acute and chronic placental insufficiency, were evaluated. In the first and second trimesters of pregnancy, the concentration of cortisol, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) was determined in the blood serum of women by enzyme immunoassay. The histories of newborns were analyzed in order to study the frequency of diseases or conditions. The risks of neonatal pathology were calculated using the Glukhovets B.I. method. The frequency of detection of diseases of various organs and systems in children under 3 years of age was established based on the analysis of data from registration forms No. 025/y (medical card of a patient receiving medical care on an outpatient basis).

Results. In the groups with ascending, hematogenous and mixed infection, cortisol levels in the 1st trimester of pregnancy were statistically significantly higher relative to the control group ($p < 0.05$). High cortisol levels in the same groups persisted in the second trimester of pregnancy. The concentration of IL-10 in groups with ascending and hematogenous infection at 11-12 weeks of pregnancy was statistically significantly reduced. An inverse correlation was found between cortisol levels and IL-10 levels in ascending and hematogenous infections. In women with signs of infection of the placenta, immature intermediate villi were more common, which indicates a violation of the maturation of the placenta. With ascending infection of the afterbirth, chronic compensated insufficiency developed statistically significantly more often, and with mixed infection – in the subcompensation stage. Fetal hypotrophy was statistically significantly more common in hematogenous infection. The frequency of detection of the analyzed groups of diseases in children with intrauterine infection was statistically significantly higher in comparison with the control.

Conclusion. The data obtained indicate a violation of the formation of the fetoplacental complex in ascending, hematogenous and mixed infection pathways due to activation of cortisol production and a decrease in IL-10 concentration at the beginning of gestation. The formation of early fetoplacental insufficiency against the background of intrauterine infection of the fetus is an additional risk factor for the health of newborns and children in the first years of life and requires careful monitoring of their health.

Keywords: intrauterine infection; fetoplacental system; cortisol; IL-6; IL-10; condition of newborns; diseases of young children

For citation: Sinyukova T.A., Mordovina I.I., Kovalenko L.V., Belotserkovtseva L.D. The effect of fetoplacental insufficiency in pregnant women with intrauterine infection on the health of newborns and young children. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 89-97. (in Russian)
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.89-97

Author's contribution: concept and design of the work – Kovalenko L.V.; collection and processing of primary data, statistical analysis, construction of tables and graphs, writing the text – Sinyukova T.A.; collection and processing of primary data, statistical analysis – Mordovina I.I.; material base, editing the text – Belotserkovtseva L.D. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: Tatyana A. Sinyukova, researcher at the Scientific and Educational Center, senior lecturer at the Department of Pathophysiology and General Pathology, e-mail: proles@bk.ru

Information about the authors:

Sinyukova T.A., <https://orcid.org/0000-0001-6079-8841>

Mordovina I.I., <https://orcid.org/0000-0003-4415-7897>

Kovalenko L.V., <https://orcid.org/0000-0002-0918-7129>

Belotserkovtseva L.D., <https://orcid.org/0000-0003-2768-8434>

Financing. The study has no sponsorship.

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

Received 12.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Плацента – уникальный орган, который обеспечивает связь между матерью и плодом, выполняя функцию транспорта питательных веществ и газообмена, необходимые для роста плода и гомеостаза [1]. Нормально функционирующая плацента обеспечивает селективный барьер, тем самым предотвращая попадание инфекций к плоду, токсинов, материнских гормонов, ксенобиотиков и других неблагоприятных факторов [1, 2].

Плацента – «свидетель» внутриутробного состояния плода. Она обладает способностью адаптироваться к неблагоприятным воздействиям окружающей среды и уменьшать их воздействие на плод, функциональная активность плаценты важна для оптимального его развития. Плацентарная дисфункция может иметь серьезные последствия для ребенка [3]. Причем это могут быть как краткосрочные, так и долгосрочные последствия, поскольку задержка роста плода или его ускорение влияют на предрасположенность к хроническим заболеваниям во взрослом периоде [4, 5].

В настоящее время в литературе активно обсуждается тема плацентарного происхождения хронических заболеваний. Плод восприимчив к программированному развитию во время беременности, что предрасполагает его к клинически выраженным заболеваниям в детском и взрослом возрасте [6, 7].

Роль патологоанатомического исследования послета в настоящее время до сих пор недооценена. Осведомленность педиатров о пользе результатов исследования послета для предикции и превенции ограничена. На наш взгляд, это упущенная возможность. Заключение о состоянии послета может быть эффективным инструментом для объяснения возникновения и течения заболеваний.

Учитывая влияние инфекции и различных неблагоприятных факторов, которые могут повлиять на уровень циркулирующих веществ, включая белки, в системном кровообращении матери, необходим поиск ранних маркеров внутриутробных инфекций [2]. На наш взгляд такими маркерами могут быть гормоны фетоплацентарного комплекса и цитокины, которые являются регуляторами межклеточных взаимодействий.

Кортизол – конечный продукт гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, играет ключевую роль в реакции организма на психологический и физиологический стресс и поддержании гомеостаза [8]. Играет важную роль во внутриутробном росте и развитии ребенка. Ферменты 11 β -гидроксиesteroиддеги-

дрогеназы I и II контролируют поступление материнского кортизола к плоду во время беременности, превращая активный кортизол в неактивный кортизон. У младенцев, подвергшихся воздействию высоких уровней кортизола во время беременности, наблюдается значительное снижение веса при рождении [9–12].

В настоящее время доказана роль плейотропного интерлейкина-6 (ИЛ-6) на разных этапах течения беременности: в имплантации, эмбриогенезе, фетальной стадии и родах. Инфекция, повреждение клеток и тканей могут повышать синтез ИЛ-6, стимулируя реакцию острой фазы воспалительной реакции [13–15].

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) ключевой противовоспалительный цитокин. Исследования показали, что ИЛ-10 играет жизненно важную роль в поддержании беременности, поскольку его экспрессия увеличивается при физиологически протекающей беременности, однако нарушается во время самопроизвольного аборта, преждевременных родов, преэклампсии [16–18].

Исследования, посвященные изучению роли кортизола, ИЛ-6 и ИЛ-10 у беременных в системном кровотоке на ранних этапах формирования фетоплацентарного комплекса на фоне течения инфекционного процесса у матери, немногочисленны, что делает наше исследование актуальным. Поиск ранних маркеров внутриутробных инфекций и уточнение механизмов развития инфекционного процесса между матерью и плодом, позволит разработать новые превентивные стратегии для улучшения здоровья матери и ребенка.

Результаты диагностики плацентарной патологии могут быть ценным ресурсом для выявления новорожденных с высокими рисками неонатальной патологии. Фундаментальные и клинические исследования должны быть направлены на поиск оценки клинического риска и современных стратегий профилактики для уменьшения долгосрочных последствий среди детей из группы высокого инфекционного риска.

Цель работы – изучить влияние фетоплацентарной недостаточности у беременных женщин на фоне внутриутробного инфицирования на состояние здоровья новорожденных и частоту выявления заболеваний различных органов и систем у детей раннего возраста (до трех лет).

Методика

В исследовании приняли участие 205 беременных женщин высокой группы риска. Всеми пациентками было подписано информированное добровольное согласие. Исследования проводились в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава

РФ от 19.06.2003 №266. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Сургутского государственного университета (протокол N 3 от 11.03.2021).

Рандомизация на группы осуществлялась по наличию инфекционно-воспалительных изменений в последе, а среди них по пути инфицирования. Сформировано 4 группы исследования: 1 – без признаков инфицирования последа ($n=59$), 2 – восходящее инфицирование ($n=69$), 3 – гематогенное ($n=33$), 4 – смешанное ($n=44$). Патологоанатомическое исследование последа новорожденных проводили по стандартной методике.

В I и II триместрах беременности в крови матери определяли концентрации цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-10) и кортизола методом иммуноферментного анализа на иммунодиагностическом анализаторе «Wallac Oy», Финляндия и автоматическом иммунохимическом анализаторе Abbott Architect i2000SR США.

Проводили анализ историй новорожденных с целью изучения частоты встречаемости заболеваний или состояний. По разработанным Глуховцом Б.И., сводным таблицам с усредненной шкалой вероятности реализации факторов риска, производили расчет рисков неонатальной патологии, основанный на ретроспективной оценке ассоциативной связи патологических процессов в последе и состоянием новорожденных с учетом акушерских преморбидных факторов [19].

Для оценки состояния здоровья детей раннего возраста (до трех лет), рожденных с признаками инфицирования последа, была изучена частота определенных

заболеваний отдельных органов и систем по данным учетных форм № 025/у ($n=69$). Медицинские карты были поделены на 4 группы в зависимости от пути инфицирования последа: 1 – контрольная ($n=14$), 2- восходящее ($n=21$), 3 – гематогенное ($n=15$), 4 – смешанное инфицирование ($n=19$).

Статистический анализ данных проводили с использованием непараметрических критериев статистики с использованием Statistica 10. Средние данные представлены как Me (Q25-Q75), абсолютные как абс. (%). Сравнение двух выборок проводили с помощью критерия Манна–Уитни (U), процентные доли оценивали критерием Фишера (ф). По методу Спирмена проводили анализ корреляционных связей. Рассчитывали 95% доверительной интервал и оценку шансов. Уровень статистической значимости результатов считали при $p<0,05$.

Результаты

Средний возраст пациенток во всех группах исследования не имел статистически значимых отличий, $p>0,05$. В группах с восходящим, гематогенным и смешанным инфицированием уровень кортизола в I триместре беременности был статистически значимо выше относительно группы контроля (1-2,3,4, $p<0,05$). Высокие показатели кортизола в этих же группах сохранялись и во II триместре беременности (рис. 1).

В начале гестации количество провоспалительного ИЛ-6 в группах с инфицированием было ниже

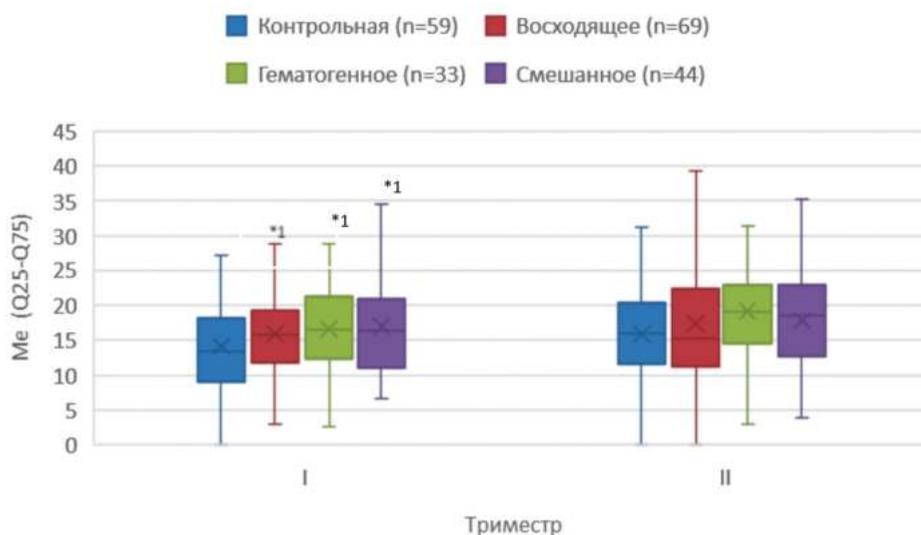


Рис. 1. Уровень кортизола в I и II триместрах беременности в сыворотке крови матери, $*p<0,05$.

Fig. 1. The level of cortisol in the I and II trimesters of pregnancy in the mother's blood serum, $*p<0,05$.

в сравнении с контрольной, но без статистически значимых отличий (табл. 1). Тогда как уровень противовоспалительного ИЛ-10 в группах с восходящим и гематогенным инфицированием в сроке 11-12 недель беременности был статистически значимо ниже контрольной группы исследования (1-2,3, $p < 0,05$). Во II триместре беременности уровень провоспалительного ИЛ-6 не менялся. Концентрация ИЛ-10 в этом же сроке беременности также продолжала оставаться несколько более низкой в группах с восходящим и гематогенным инфицированием, но без статистически значимых отличий (табл. 1).

При этом нами была обнаружена обратная отрицательная корреляционная связь между уровнем кортизола и уровнем ИЛ-10 при восходящем инфицировании во II триместре ($r_s = -0,51$), при гематогенном – в I ($r_s = -0,67$) и II ($r_s = -0,51$) триместрах беременности.

Патоморфологическое изучение последа показало, что при восходящем инфицировании воспалительный процесс носит стадийный характер от поражения оболочек (36,23%), ворсинчатой части (30,44%) до поражения всего последа, включая пуповину (30,44%). При гематогенном инфицировании воспалительный процесс ограничен только плацентой (100%). При смешанном инфицировании в воспалительный процесс чаще вовлечены оболочки и плацента – 68,18% (2-4, $p < 0,01$), в 27,27% случаев достигая 3 стадии поражения последа. При этом в группах, достигающих 3 стадии поражения последа, отмечены морфологические признаки

развития системного воспалительного ответа плода при восходящем и смешанном инфицировании.

Анализируя результаты, полученные при гистологическом исследовании плацент, нами выявлено, что в контрольной группе плаценты соответствовали гестационному сроку статистически значимо чаще, чем в группах с различными путями инфицирования (52,54% vs 36,23%; 27,27%; 34,09%; 1-2,3,4, $p < 0,05$). Из наиболее часто встречающихся признаков патологической незрелости плаценты нами установлены промежуточные незрелые ворсины и вариант диссоциированного развития.

В группах с восходящим (53,62%), гематогенным (54,54%) и смешанным (54,54%) инфицированием частота выявления патологической незрелости по типу незрелых промежуточных ворсин (ОШ=2,25; ОШ=2,34 и ОШ=2,34) имеет статистически значимые отличия от группы контроля ($p < 0,05$). Клинические проявления хронической плацентарной недостаточности были подтверждены гистологическим исследованием плацент у 67,79% ($n=40$), 88,40% ($n=61$), 87,87% ($n=29$) и 84,08% ($n=37$) женщин в группах 1-4 исследования соответственно. В группе с восходящим инфицированием (ОШ=1,94 [0,92-4,10]) достоверно чаще плацентарная недостаточность выявлялась в стадии компенсации, а при смешанном инфицировании (ОШ=4,05 (1,03-12,55)) – в стадии субкомпенсации. При этом в группе контроля, также выявлены гистологические признаки плацентарных

Таблица 1/Table 1

Содержание ИЛ-6 и ИЛ-10 в I и II триместрах беременности в сыворотке крови матери

The content of IL-6 and IL-10 in the first and second trimesters of pregnancy in maternal blood serum

Признак	Контрольная ($n=59$)	Восходящее ($n=69$)	Гематогенное ($n=33$)	Смешанное ($n=44$)
	1	2	3	4
I триместр				
ИЛ-6, пг/мл	1,92 (1,60;10,2)	1,60 (1,6; 3,4)	1,60 (1,6; 4,4)	1,6 (1,6; 9,24)
ИЛ-10, пг/мл	7,20 (2,5; 17,2)	2,50 (2,5; 9,8) *1	2,50 (2,5; 10,1) *1	7,7 (2,5; 12,12)
II триместр				
ИЛ-6, пг/мл	2,00 (1,6; 7,32)	1,60 (1,6; 5,6)	1,60 (1,6; 5,5)	1,95 (1,6; 11,3)
ИЛ-10, пг/мл	7,40 (2,5; 13,8)	4,00 (2,5; 10,4)	6,40 (2,5; 9,46)	7,30 (2,5; 13,7)

Примечание. * различия статистически значимы при $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Note. * the differences are statistically significant at $p < 0,05$ relative to the control group.

нарушений в стадии компенсации (59,32%, $n=35$), что указывает на поликомпонентность причин формирования данного синдрома.

Анализ состояния здоровья детей при рождении показал, что дети рождались в состоянии асфиксии статистически значимо чаще при восходящем – 17,57% (2-1, $p<0,01$; 2-3 $p<0,05$) и смешанном инфицировании – 18,18% (4-1, $p<0,01$; 4-3, $p<0,05$). Тяжелая степень асфиксии диагностировалась в единичных случаях и только при восходящем и гематогенном инфицировании. Гипотрофия плода достоверно чаще была диагностирована у новорожденных с признаками гематогенного инфицирования относительно контрольной группы исследования – 21,21% (3-1, $p<0,05$). У новорожденных в группах с восходящим и смешанным путях инфицирования были диагностированы инфекционные поражения кожи и слизистых оболочек в 1,44% и 4,54% случаев. Кроме того, только в группе со смешанным инфицированием у новорожденных был обнаружен респираторный дистресс-синдром – 4,54% (рис. 2).

По данным патоморфологического заключения последа и оценке состояния новорожденного, нами были рассчитаны риски развития неонатальной патологии (рис. 3). В целом в группах с признаками инфицирования фетоплацентарного комплекса можно отметить высокие риски неонатальной патологии,

особенно они разнообразны в группе со смешанным инфицированием. В группе с гематогенным инфицированием риск перинатального поражения центральной нервной системы у детей статистически был значимо выше – 33,33% (3-1, $p<0,05$) в сравнении с контролем. Риск респираторного дистресс-синдрома в группе со смешанным инфицированием был выше остальных групп и значимо чаще в сравнении с контрольной группой – 22,72% (4-1, $p<0,01$).

Нами был проведен анализ учетных форм № 025/у (медицинская карта пациента, получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях) у детей, родившихся от беременных женщин в нашем исследовании, возраст наблюдения – до трех лет. Рассматривали окончательно установленные диагнозы у детей. Было выявлено, что дети, рожденные от матерей с признаками внутриутробного инфицирования последа, имели патологию раннего неонатального периода и у них чаще выявлялись заболевания отдельных органов и систем, особенно в группе со смешанным инфицированием (табл. 2).

Заболевания нервной системы (церебральная возбудимость и депрессия, расстройства вегетативной нервной системы) статистически значимо чаще были диагностированы у детей в группах с признаками гематогенного (40%, 2-1, $p<0,05$) и смешанного (63,15%, 4-1,2, $p<0,01$) инфицирования фетоплацентарного комплекса. Острые

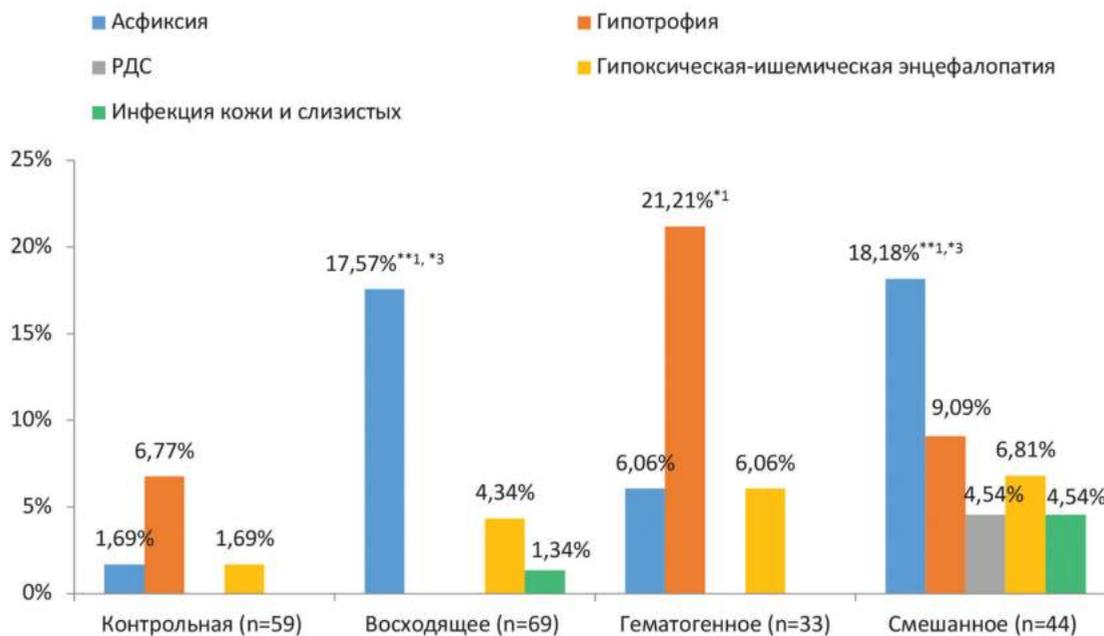


Рис. 2. Оценка состояния здоровья новорожденных, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Fig. 2. Assessment of the health status of newborns, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

болезни органов дыхания в виде синусита, ларингита, трахеита, бронхита, пневмонии статистически значимо чаще встречались в группах с восходящим (57,15% 2-1, $p < 0,05$) и смешанным (73,68% 4-1,3, $p < 0,01$) инфицированием. Функциональные заболевания желудочно-кишечного тракта (функциональное срыгивание, младенческие колики, функциональная диарея, функциональный запор) были зафиксированы во всех группах с инфицированием, но с особенно высокой частотой выявления (26,66%) при гематогенном инфицировании. Заболевания мочеполовой системы (циститы, уретриты) были выявлены в группах с восходящим (9,52%) и смешанным инфицированием (5,26%). Заболевания кожи у детей в виде атопического дерматита с дебютом на третьем месяце жизни чаще установлены в группе со смешанным инфицированием (15,78%).

Заключение

Многочисленные иммунные сигнальные пути и цитокины во время физиологического течения беременности способствуют здоровой и успешной бере-

менности и определяют защиту от патогенов [20]. Однако влияние окружающих факторов, наличие инфекции у матери, изменения функциональной активности иммунной системы во время гестации, могут привести к тяжелым осложнениям беременности и оказать патологическое воздействие на течение беременности и развивающийся плод [21].

Как показали наши исследования, проникновение инфекции восходящим, гематогенным или смешанным путем приводит к нарушению формирования фетоплацентарного комплекса, за счет значимого повышения кортизола на ранних сроках беременности. Наше исследование подтверждает данные других авторов о влиянии вирусной инфекции на изменение активности фермента 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы I и II типов, реципрокно регулирующего продукцию и активность кортизола [22].

Одновременно высокий уровень кортизола снижает синтез противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Такие изменения приводят к иммунной дисфункции, к прогрессирующему снижению маточно-пла-

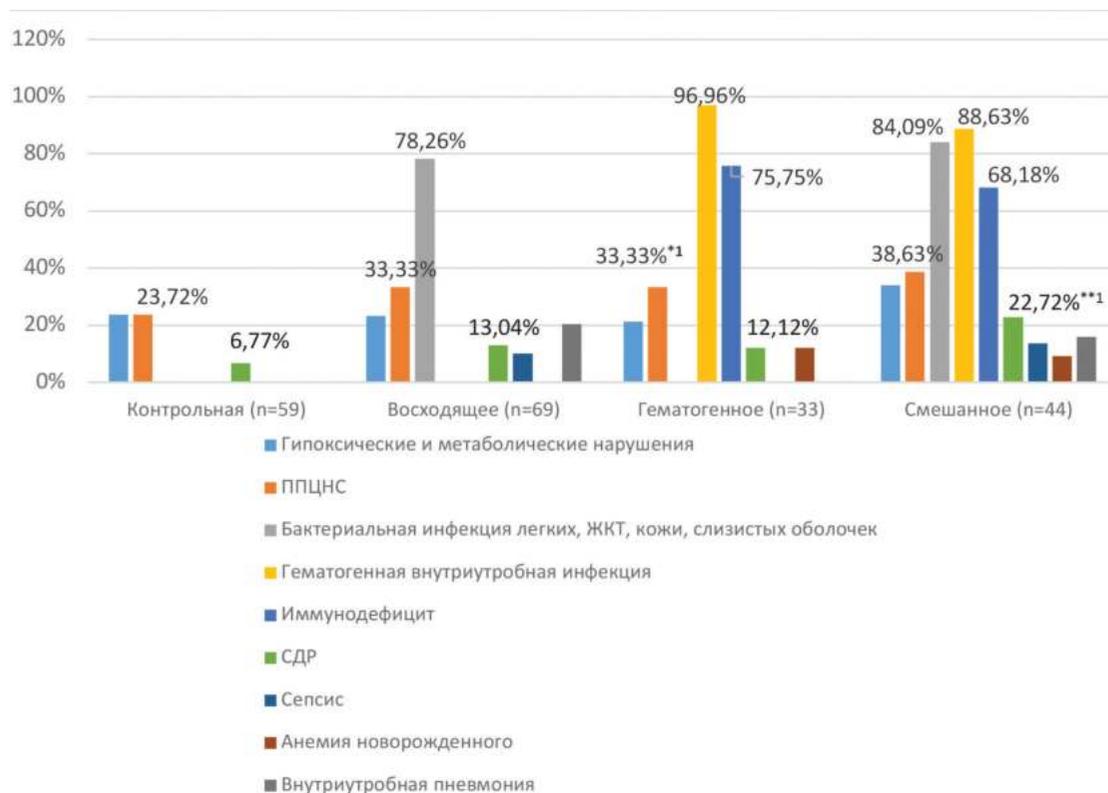


Рис. 3. Частота встречаемости рисков неонатальной патологии у детей при инфицировании последа, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fig. 3. Frequency of occurrence of risks of neonatal pathology in children with infection of the afterbirth, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Таблица 2/ Table 2

Частота выявления отдельных групп заболеваний у детей раннего возраста (абс, %)

The frequency of detection of certain groups of diseases in young children (abs, %)

Заболевание	Контрольная (n=14)	Восходящее (n=21)	Гематогенное (n=15)	Смешанное (n=19)
	1	2	3	4
Болезни нервной системы	1(7,14%)	5(23,81%)	6(40,00%)* ¹	12(63,15%)* ^{1,2}
Болезни крови, кроветворных органов	1(7,14%)	-	2(13,33%)	3(15,78%)
Болезни органов дыхания	3 (21,43%)	12(57,15%)* ¹	5(33,33%)	14(73,68%)* ^{1,3}
Болезни органов пищеварения	-	3(14,28%)	4(26,66%)	2(10,52%)
Болезни мочеполовой системы	-	2(9,52%)	-	1(5,26%)
Заболевания кожи	-	-	1(6,66%)	3(15,78%)

Примечание. Различия статистически значимы * p<0,05, ** p<0,01.

Note. The differences are statistically significant * p<0,05, ** p<0,01.

центарного кровотока, нарушению функциональной активности плаценты и формированию фетоплацентарной недостаточности на ранних этапах ее развития, так как ИЛ-10 является ключевым медиатором плацентарного ангиогенеза.

Патологическое формирование фетоплацентарного комплекса подтверждено патоморфологическим исследованием последа, где во всех группах с признаками инфицирования достоверно увеличивается частота встречаемости незрелых промежуточных ворсин в плаценте. Это свидетельствует об инфицировании плацентарной ткани на этапе ее развития. В дальнейшем это приводит к возникновению компенсированной фетоплацентарной недостаточности при восходящем и в стадии субкомпенсации при смешанном путях инфицирования. При гематогенном инфицировании такие изменения обуславливают недостаточный рост плода, что статистически значимо подтверждено в данном исследовании.

Учитывая раннее формирование фетоплацентарной недостаточности при инфицировании фетоплацентарного комплекса и наличие высоких рисков неонатальной патологии, которые можно выявить при патоморфологическом обследовании последа и оценке состояния новорожденного, наше исследование подтверждает более высокую частоту выявления заболеваний отдельных органов и систем у детей раннего возраста в этих группах. Однако воздействие эпигенетических факторов в течение жизни может привести не только к реализации этих факторов в раннем возрасте, но и в будущем, особенно это касается критических периодов развития ребенка.

Выводы:

1. В качестве диагностических маркеров нарушения развития фетоплацентарного комплекса у беременных женщин высокой группы инфекционного риска в первом триместре беременности целесообразно использование определения уровня кортизола и ИЛ-10 в сыворотке крови в первом триместре беременности.

2. Фетоплацентарная недостаточность инфекционного генеза приводит к развитию патологических состояний у новорожденных, таких как асфиксия, гипотрофия, перинатальные поражения центральной нервной системы и другие, а также высокой частоте развития заболеваемости у детей до трех лет жизни.

3. Необходимо проведение патоморфологического исследования последа и расчета рисков неонатальной патологии для предиктивных, персонализированных и превентивных подходов в неонатологии и педиатрии.

Литература

(п.п. 1-18; 20; 21 см. References)

19. Глуховец, Б.И., Глуховец Н.Г. *Восходящее инфицирование фето-плацентарной системы*. М.: МЕДпресс-информ; 2006. ISBN 5-98322-141-8.

22. Луценко М.Г., Довжикова И.В., Андриевская И.А. *Изменение образования глюкокортикоидов при реактивации цитомегаловирусной инфекции во время беременности*. Proceedings of articles the international scientific conference «Advances of Science» (29-30 march 2016, Czech Republic, Karlovy Vary – Russia, Moscow), Czech Republic, Karlovy Vary – Russia, Moscow; 2016; 191-9.

References

- Joseph S., Walejko J.M., Zhang S., Edison A.S., Keller-Wood M. Maternal hypercortisolemia alters placental metabolism: a multiomics view. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020; 319(5): E950-E960.
- Vuppaladhiam L., Lager J., Fiehn O., Weiss S., Chesney M., Hasdemir B., et al. Human placenta buffers the fetus from adverse effects of perceived maternal stress. *Cells.* 2021;10(2):379.
- Burton G.J., Fowden A.L., Thornburg K.L. Placental origins of chronic disease. *Physiol Rev.* 2016.; 96(4): 1509-65.
- Jane K. Cleal, Rohan M. Lewis,ane K. Cleal, Rohan M. Lewis. The placenta and developmental origins of health and disease. *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease.* Academic Press. 2016; 439-461.
- Behura S.K., Dhakal P., Kelleher A.M., Balboula A., Patterson A., Spencer T.E. The brain-placental axis: Therapeutic and pharmacological relevancy to pregnancy. *Pharmacol Res.* 2019; 149: 104468.
- Myatt L., Thornburg K.L. Effects of prenatal nutrition and the role of the placenta in health and disease. *Methods Mol Biol.* 2018; 1735: 19-46.
- Aplin, J.D., Myers, J.E., Timms, K. et al. Tracking placental development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2020; 16: 479–94.
- Möllers L.S., Yousuf E.I., Hamatschek C., Morrison K.M., Hermanussen M., Fusch C., et al. Metabolic-endocrine disruption due to preterm birth impacts growth, body composition, and neonatal outcome. *Pediatr Res.* 2022; 91(6): 1350-60.
- Yliniemi A., Makikallio K., Korpimäki T., Kouru H., Marttala J., Ryyänen M. Combination of PAPPa, fhCGβ, AFP, PlGF, sTNF-R1, and maternal characteristics in prediction of early-onset preeclampsia. *Clin Med Insights Reprod Health.* 2015; 9: 13–20.
- Epstein C.M., Houfek J.F., Rice M.J., Weiss S.J. Integrative Review of Early Life Adversity and Cortisol Regulation in Pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2021; 50(3): 242-55.
- Fowden A.L., Forhead A.J. Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. *Exp Physiol.* 2015; 100: 1477–87.
- Lazarides C., Ward E.B., Buss C., Chen W.P., Voelkle M.C., Gillen D.L., et al. Psychological stress and cortisol during pregnancy: An ecological momentary assessment (EMA)-Based within- and between-person analysis. *Psychoneuroendocrinology.* 2020; 121: 104848.
- Omere C., Richardson L., Saade G.R., Bonney E.A., Kechichian T., Menon R. Interleukin (IL)-6: A Friend or Foe of pregnancy and parturition? Evidence from functional studies in fetal membrane cells. *Front Physiol.* 2020; 11: 891.
- Farias-Jofre M., Romero R., Galaz J., Xu Y., Miller D., Garcia-Flores V., et al. Blockade of IL-6R prevents preterm birth and adverse neonatal outcomes. *EBioMedicine.* 2023; 98: 104865.
- Ali S., Majid S., Ali M.N., Taing S., Rehman M.U., Arafah A. Cytokine imbalance at materno-embryonic interface as a potential immune mechanism for recurrent pregnancy loss. *Int Immunopharmacol.* 2021; 90: 107118.
- Cubro H., Kashyap S., Nath M.C., Ackerman A.W., Garovic V.D. The role of Interleukin-10 in the pathophysiology of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2018; 20(4): 36.
- Mobini M., Mortazavi M., Nadi S., Zare-Bidaki M., Pourtalebi S., Arababadi M.K. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J Basic Med Sci.* 2016; 19(2): 119-24.
- Negi V.D., Khurana S., Bonney E.A. Interleukin-10 delays viral clearance in the placenta and uterus of mice with acute lymphocytic choriomeningitis virus infection during pregnancy. *Front. Virol.* 2022; 2: 829991.
- Gluhovets B.I., Gluhovets N.G. *Ascending infection of the fetoplacental system. [Voskhodyashchee infitsirovanie fetoplacentalnoy sistemy].* Moscow: MEDpress-inform; 2006. ISBN 5-98322-141-8.
- Mor G., Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(6): 425-33.
- Kumar M., Saadaoui M., Al Khodor S. Infections and pregnancy: effects on maternal and child health. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 12: 873253.
- Lutsenko M.T., Dovzhikova I.V., Andrievskaya I. A Proceedings of articles the international scientific conference «Advances of Science» (29-30 march 2016, Czech Republic, Karlovy Vary – Russia, Moscow), Moscow; 2016; 191-9.

Сведения об авторах:

Синюкова Татьяна Александровна, науч. сотр., ст. преподаватель каф. патофизиологии и общей патологии СурГУ, e-mail: proles@bk.ru;

Мордовина Инна Игоревна, канд. мед. наук, доц., каф. акушерства, гинекологии и перинатологии СурГУ, e-mail: mordovina_ii@surgu.ru;

Коваленко Людмила Васильевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и общей патологии, директор мед. института СурГУ, e-mail: kovalenko_lv@surgu.ru;

Белоцерковцева Лариса Дмитриевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. акушерства, гинекологии и перинатологии СурГУ, belotserkovtseva_ld@surgu.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-008

Степанова О.И.¹, Алчинова И.Б.², Черепов А.Б.², Метёлкин А.А.², Карганов М.Ю.²,
Никольская А.О.³, Клёсов Р.А.¹, Семёнов Х.Х.¹, Онищенко Н.А.³, Басок Ю.Б.³

Динамика состояния клеток крови и костного мозга у мышей при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа

¹ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, 143442, МО, Красногорский район, Россия, п. Светлые горы, д. 1;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва, Россия, ул. Щукинская, д. 1

Цель работы: изучить динамику состояния клеток крови и костного мозга при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа (СД2) в зависимости от степени тяжести нарушений окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в тканях организма.

Методика. Использована генетическая модель СД2 у мутантных мышей – *db/db* (опытная группа $n=30$). Контролем служили здоровые мыши той же линии – *db/+m* ($n=10$) и линии *B10* ($n=5$). В течение 6–6,5 мес контролировали: динамику клинических показателей (глюкоза крови, гликозилированный гемоглобин, масса тела) и состояние ОВП в тканях организма по уровню активности НАДН, ФАД и показателю окислительного метаболизма (ПОМ) с помощью аппарата «Лазма-СТ». В течение того же срока исследовали состояние клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) и костного мозга. Статистическую обработку результатов проводили с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса; достоверность различий с контролем оценивали с помощью параметрического t – критерия Стьюдента, при $p<0,05$.

Результаты. В развитии СД2 выявлено 3 стадии прогрессирующего нарушения метаболизма и ОВП: I – стадия адаптации (1,0–2,0 мес); II – стадия прогрессирующей дисадаптации (2,5–4,5 мес); III – стадия декомпенсации (5,0–6,5 мес). Установлено, что уже в I стадии у мышей *db/db* снижалось содержание эритроцитов, Hb г/л и лейкоцитов. Во II и особенно в III стадиях происходило повышение тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов. В костном мозге у мышей *db/db* уже в I, но особенно в III стадии определялось снижение доли живых и повышение количества поврежденных клеток, преимущественно за счёт апонекротических клеток.

Заключение. По мере прогрессирования СД2 и выраженного снижения эффективности ОВП, особенно на III стадии – в организме тормозятся процессы кроветворения и усиливаются нарушения в соотношении клеточных популяций нейтрофилы/лимфоциты, что свидетельствует о развитии тяжёлой гипоксии, активации системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития опасных осложнений.

Ключевые слова: сахарный диабет; окислительно-восстановительные процессы; клетки крови и костного мозга

Для цитирования: Степанова О.И., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Карганов М.Ю., Никольская А.О., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Онищенко Н.А., Басок Ю.Б. Динамика состояния клеток крови и костного мозга у мышей при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(1): 98–108.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.98-108

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Онищенко Н.А., Карганов М.Ю.; сбор материала – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Никольская А.О.; техническая подготовка материала – Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Никольская А.О., Семёнов Х.Х.; подготовка иллюстративного материала к публикации – Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Степанова О.И., Никольская А.О.; написание текста – Онищенко Н.А.; редактирование – Карганов М.Ю., Басок Ю.Б. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Степанова Ольга Ивановна, e-mail: olgsima50@mail.ru

Финансирование. Работа частично выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№FGFU-2022-0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Stepanova O.I.¹, Alchinova I.B.², Cherepov A.B.², Metelkin A.A.², Karganov M.Yu.², Nikolskaya A.O.³, Klesov R.A.¹, Semenov Kh.Kh.¹, Onishchenko N.A.³, Basok Yu.B.³

The dynamics of changes in blood cells and bone marrow of mice with progressive type 2 diabetes mellitus

¹Scientific Center of Biomedical Technologies FMBA of Russia, Svetlye Gory village 1, Moscow Region, 143442, Krasnogorsk district, Russian Federation;

²Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation;

³Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, 1 st. Shchukinskaya, Moscow, 123182, Russian Federation

Aim: to study the dynamics of changes in the blood and bone marrow cells during the progression of type 2 diabetes mellitus (DM2) depending on the severity of redox (RO) disorders in tissues.

Methods. A genetic model of DM2 in mutant db/db mice (experimental group, $n=30$) was used. The control group consisted of the same mouse strain, db/+m ($n=10$), and the B10 strain ($n=5$). Time-related changes in clinical variables (blood glucose, HbA1c, body weight) and the tissue RO status were monitored for 6-6.5 months. The RO status was evaluated by the NADH concentration, FAD activity, and the indicator of oxidative metabolism (IOM) using a Lasma-ST apparatus. During the same period, the condition of blood cells (erythrocytes, leukocytes, platelets) and bone marrow cells was examined. Statistical analysis was performed with a preliminary *Shapiro-Wilks* normality test followed by the parametric Student's *t*-test. Differences from the control were considered significant at $p<0.05$.

Results. During the development of DM2, three stages of progressive metabolic and RO disorders were identified: I: stage of adaptation (1.0-2.0 months); II, stage of progressive maladaptation (2.5-4.5 months); III, stage of decompensation (5.0-6.5 months). In db/db mice already at stage I, erythrocytes, Hb and leukocytes were decreased. At stages II and especially III, platelets, neutrophils, monocytes, and eosinophils were increased whereas lymphocytes were reduced. In the bone marrow of db/db mice, already in stage I, but even more in stage III, the proportion of living cells was decreased and the proportion of damaged cells was increased, primarily due to the contribution of aponecrotic cells.

Conclusion. With the progression of DM2 and a pronounced decrease in the effectiveness of RO processes, especially at stage III, the hematopoietic processes were inhibited and the disorders in the neutrophil/lymphocyte cell population ratio intensified. This indicates the development of severe hypoxia, activation of a systemic inflammatory response, and inhibition of reparative processes that create conditions for development of dangerous complications.

Keywords: diabetes mellitus; redox processes; blood and bone marrow cells

For citation: Stepanova O.I., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Karganov M.Yu., Nikolskaya A.O., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Onishchenko N.A., Basok Yu.B. Dynamics of the state of blood cells and bone marrow in mice with the progressive. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 98-108. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.98-108

Author's contribution: concept and design of the study – Onishchenko N.A., Karganov M.Yu.; collection of material – Stepanova O.I., Klesov R.A., Nikolskaya A.O.; technical preparation of the material Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Stepanova O.I., Klesov R.A., Nikolskaya A.O., Semenov Kh.Kh.; preparation of illustrative material for publication – Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Stepanova O.I., Nikolskaya A.O.; writing the text – Onishchenko N.A.; editing the text – Karganov M.Yu., Basok Yu.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Olga I. Stepanova*, e-mail: olgsima50@mail.ru

Information about the authors:

Stepanova O.I., <https://orcid.org/0009-0005-6511-3975>

Alchinova I.B., <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Cherepov A.B., <https://orcid.org/0000-0002-3757-5292>

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

Karganov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>

Nikolskaya A.O., <https://orcid.org/0000-0001-7410-6500>

Klesov R.A., <https://orcid.org/0000-0001-8029-6486>

Onishchenko N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0889-8674>

Basok Yu.B., <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Financing. The work was partially carried out within the framework of the state assignment on the topic: «Assessment of the body's adaptive reactions to the action of physicochemical and environmental factors» (No. FGFU-2022-0010).

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

Received 15.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

По современным воззрениям сахарный диабет 2 типа (СД2) представляет собой хроническое мультифакторное заболевание [1, 2], ранним клиническим проявлением которого является постепенно прогрессирующая гипергликемия, обусловленная развитием резистентности тканей к инсулину, создающей благоприятные условия для возникновения и прогрессирования опасных для жизни осложнений [3–5]. Исследованиями последних лет показано [6], что гипергликемия уже сама по себе оказывает повреждающее воздействие на различные ткани организма за счёт токсичности гликированных белков и липопротеидов, накапливающихся в эритроцитах и других клетках. Так, костный мозг, в ежедневном режиме продуцирующий различные типы клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты), оказался одним из наиболее чувствительных органов к повреждающему воздействию гликолизированных белков, накапливающихся в эритроцитах [7]. В результате эритроциты, которые изменяют свои свойства, вместе с тромбоцитами и лейкоцитами становятся активными участниками развития микро – и макрососудистых осложнений при СД2 [8]. Работы последних лет убеждают в том, что развитие нарушений в состоянии клеток крови и костного мозга при СД2 зависит не столько от тяжести повреждения секреторной функции островковых клеток поджелудочной железы, сколько от выраженности действия комплекса факторов, подавляющих функцию ещё жизнеспособных β -клеток. В роли таких факторов выступают: воспаление, глюко-токсичность, липотоксичность, оксидативный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума, а также изменения кишечной микрофлоры и барьерных свойств слизистой кишечника [3, 9–11]. Эти факторы способствуют нарушению метаболизма путём торможения окислительно – восстановительных процессов (ОВП) в клетках всех органов и тканей организма, в том числе в клетках крови и костного мозга. Между тем, работ, устанавливающих взаимосвязь степени выраженности нарушений в состоянии клеток крови и костного мозга от степени выраженности угнетения ОВП в тканях организма при прогрессирующем развитии СД2 мы в доступной литературе не обнаружили.

Цель работы: на генетической модели СД2 у мышей изучить динамику состояния клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) и костного мозга на фоне нарастающей гипергликемии и нарушений окислительно – восстановительных процессов в тканях организма в зависимости от степени тяжести нарушений ОВП при прогрессирующем развитии СД2.

Методика

Динамику нарушений метаболизма, а также изменений в состоянии клеток крови и костного мозга при СД2 изучали на мутантных (гомозиготных) мышах C57BL/KsJYLeprdb/+(B/Ks-Leprdb/+) – (*db/db*), которые несут рецессивный ген – *leptin receptor – Leprdb* – (*db*) (8 группа сцепления, 4 хромосома). Ген *db* в гомозиготном состоянии вызывает прогрессирующее развитие СД, что обусловлено снижением рецептор – опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину. Развивающийся СД сходен с СД2 и характеризуется деградацией β -клеток в островках поджелудочной железы, но без дефицита выработки инсулина на ранних сроках. Общее количество мутантных мышей – диабетиков линии B/Ks-Leprdb/Leprdb (*db/db*) обоих полов, использованных в эксперименте, составило 30 голов ($n=30$). Контролем служили фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии – B/Ks-Leprdb/+ – (*db/+m*) ($n=10$) и мыши линии C57BL/10 – (B10) ($n=5$). Общее количество мышей, использованных в эксперименте, составило 45 голов.

У этих мышей в течение 6 – 6,5 мес в динамике изучали изменения ряда функциональных показателей, развивающихся при СД2, которые отражают степень тяжести клинического состояния животного. Измеряли содержание глюкозы в крови, гликолизированного гемоглобина в эритроцитах и массу тела, а также проводилась оценка состояния ОВП в тканях организма. Содержание глюкозы определяли в свежей венозной (капиллярной) крови фотометрическим методом на приборе Ассу-Чек (Швейцария), а % содержание гликолизированного гемоглобина (HbA1c,%) – на приборе Nycocard REDER (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c методом боратного аффинного анализа. Вес животных определяли с помощью весов Mettler BD202 (Швейцария). Динамическая оценка состояния ОВП производилась неинвазивно с помощью аппарата лазерной доплеровской флуометрии – «Лазма – СТ» [12]. Этот аппарат позволяет измерять микроциркуляцию крови и лимфы в тканях хвоста, определять в этих тканях уровень активности митохондриальных коферментов – НАДН, ФАД и на основании полученных результатов автоматически рассчитывать показатель окислительного метаболизма (ПОМ) [12]. Определение в динамике в процессе жизни животных тканевого уровня микроциркуляции, активности митохондриальных коферментов, показателя окислительного метаболизма, а также содержания глюкозы в крови позволило выя-

вить 3 стадии развивающихся нарушений метаболизма в организме мутантных мышей с СД2: 1.0 – 2.0 мес после рождения – стадия адаптивных изменений – (1), 2,5 – 4,5 мес – стадия прогрессирующей дисадаптации – (2) и 5.0 – 6,5 мес – стадия декомпенсации метаболизма – (3) (см. раздел «Результаты»). Именно на этих сроках у мышей с СД2 нами было проведено исследование динамики изменения состояния клеток крови и костного мозга.

Для исследования клеток крови динамике развития CD2 смешанную кровь забирали в пробирки с K_3 ЭДТА. Оценку гематологических показателей – (RBC $10^{12}/л$ – эритроциты, HGB, г/л – гемоглобин, HCT, % – гематокрит, MCV, фемтолитр – средний объём эритроцита, MCH, пикограмм – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC, г/л – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, RDW-CV, % – ширина распределения эритроцитов, RDW-SD, % – ширина распределения эритроцитов (стандартное отклонение); PLT $10^9/л$ – тромбоциты, PDW, % – относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму, PCT, % – тромбокрит, MPV, фемтолитр – средний объём тромбоцита; WBC $10^9/л$ – лейкоциты, Neu, % – нейтрофилы, Lymph, % – лимфоциты, Mono, % – моноциты, Eosi, % – эозинофилы, Basis, % – базофилы) проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIND VET DF50 (Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Данные представляли как средний результат из трёх замеров.

Клетки костного мозга выделяли из бедренной и большой берцовой костей мышей с использованием стандартного протокола [13]. Целые кости (бедренную и большую берцовую) выделяли из задних конечностей мышей и тщательно очищали от мышц и связок, после чего отсекали эпифизы и кости помещали в 0,5 мл стандартные пластиковые центрифужные пробирки с заранее прокаланным с помощью иглы (G18-21) дном. Эти пробирки помещали внутрь пластиковых центрифужных пробирок объемом 1,5 мл и центрифугировали 15 с при 10 000 g. Комок клеток костного мозга, очищенный от костных тканей, оказывался в большой центрифужной пробирке.

Для оценки выраженности апоптоза клеток костного мозга использовали детекцию фосфатидилсерина на внешней мембране клеток с помощью меченого аннексина V. Количество аннексин-положительных (аннексин+) клеток оценивали, используя набор для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF 488 (Lumiprobe, Россия) по стандартному протоколу с последующей проточной цитометрией [14].

Полученные клетки костного мозга были суспендированы пипетированием в 100 мкл буфера для связывания из набора для определения аннексина V при комнатной температуре. Из этой суспензии отбирали такое количество клеток, чтобы их концентрация в реакционном объеме (100 мкл) составляла $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Добавляли аннексин V-AF488 до концентрации 3 мкг/мл и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 400 мкл охлажденного буфера для связывания. Для определения целостности клеточной мембраны использовали йодистый пропидий. Его добавляли в пробы перед измерением на проточном цитометре до концентрации 0,5-1 мкг/мл.

Свежеприготовленные образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США), оснащенный аргонным лазером (488 нм). Эмиссию флуоресценции (AF488, FITS) регистрировали в канале FL1 (515-545 нм) и в диапазоне йодистого пропидия FL2 (620 нм). Для каждого образца накапливалось от 15 000 до 25 000 событий. Сбор данных проводили с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson, США). Данные, полученные в пилотном исследовании, обрабатывали в программе FlowJo. Анализ результатов проводили с учетом рекомендаций, изложенных Crowley LC с соавторами [14], но без установки таргетного гейта.

Численные значения показателей окислительного метаболизма, глюкозы, гликолизированного гемоглобина и массы тела подвергали статистической обработке на персональном компьютере с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса на небольшом количестве выборок ($n > 5$) для доказательства нормального распределения данных, характеризующих метаболизм в отдельные периоды. Достоверность различия сравниваемых показателей оценивали с помощью t – критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Excel 2007), при $p < 0,05$.

Результаты

Динамическое исследование глюкозы у мышей опытной группы – *db/db* (модель СД2) показало, что уже на 3-4 неделе их жизни – уровень глюкозы в крови повышался с 4,3 – 6,0 ммоль/л (исходный уровень сразу после рождения) до 9 – 13 ммоль/л и в среднем составил $10,3 \pm 2,4$ ммоль/л. Содержание гликолизированного гемоглобина также повышалось с 3,0 – 3,5% до $4,9 \pm 1,0\%$, а уже к 6 – 7 неделе превышало 5,2 – 6,1%. Дальнейшее измерение содержания глюкозы и HbA1c в крови мышей опытной и контрольной групп (здоровые гетерозиготные мыши) на 2, 4 и 6 мес после рождения позволило установить, что в опытной груп-

пе нарушение углеводного обмена продолжает прогрессировать и достоверно отличается от аналогичных измеряемых показателей в контрольных здоровых группах – гетерозиготных мышей *db/+m* и мышей *B10* (см. табл. 1)

При сравнении возрастных изменений массы тела мышей линии *db/db* с контрольными группами было отмечено достоверное превышение их массы тела по сравнению с контролями на сроках 1, 2 и 4 мес, что свидетельствует о развитии у них ожирения, типичного для СД2. Однако, начиная с 4, 5 и до 6 мес у мышей *db/db* наступала быстрая потеря веса.

Масса тела этих мышей становилась достоверно ниже контролей, животные выглядели истощенными, причём уровень глюкозы и *HbA1c* в крови продолжал увеличиваться, хотя и в более замедленном темпе. Для мышей *db/db* были характерны и другие клинические признаки СД2, такие как полидипсия, полифагия и полиурия, которые становились отчётливо выраженными со 2 мес после рождения. В среднем за сутки эти мыши выпивали до 25-30 мл (25,74±1,18) воды,

тогда как животные контрольных групп в среднем 4-5 мл (4,69±0,35; *p*<0,05). Мыши *db/db* съедали больше кормов (в граммах) за сутки (8,90±0,29; *p*<0,05), чем в контрольных группах (3,74±0,096; *p*<0,05) (контроль проводился по брикетированному корму). При динамическом измерении микроциркуляторно – тканевых показателей, характеризующих состояние ОВП у мышей *db/db* и здоровых мышей *db/+m*, было установлено (рис. 1), что на сроке жизни 1,5 мес на фоне нарастающей гипергликемии (табл. 1) амплитуда концентрации НАДН составила 0,77±0,21 (норма 0,54±0,15), амплитуда концентрации ФАД – 1,27±0,45 (норма 0,77±0,13) и ПОМ – 9,42±3,15 (норма 13,95±4,98). Однако выявленные различия показателей состояния ОВП при сравнении с контролями были недостоверны. Эта I стадия развития СД2 была названа нами периодом адаптации. Формирование у диабетических мышей *db/db* первых клинических признаков дисадаптации обнаруживается в возрасте 2,0 – 2,5 мес, когда у 14% мышей этой возрастной группы констатируется значительное повышение веса, уровня гликемии (до 18,70±3,83) и появле-

Таблица 1/Table 1

Возрастная динамика изменений содержания глюкозы, *HbA1c*, % и массы тела у мышей линий *db/db*, *db/+m* и *B10*

Age dynamics of glucose content, *HbA1c*, % and body weight in *db/db*, *db/+m* and *B10* mice

Показатели углеводного обмена и массы тела	Линии мышей		
	<i>db/db</i> (СД 2) 1-я группа (n=30)	<i>db/+m</i> (контроль) 2-я группа (n=10)	<i>B10</i> (контроль) 3-я группа (n=5)
Возраст 1 мес			
Глюкоза, ммоль/л	10,3±2,4*	5,4±0,5	5,6±0,3
<i>HbA1c</i> , %	4,9±1,0*	3,5±0,07	3,0±0,08
Масса тела, г.	21±2,5*	13±1,2	15±1,8
Возраст 2 мес			
Глюкоза, ммоль/л	18,7±3,83*	5,8±0,42	5,9±0,03
<i>HbA1c</i> , %	7,9±1,11*	3,6±0,1	3,2±0,13
Масса тела, г.	39±2,37*	15±2,69	18±2,49
Возраст 4 мес			
Глюкоза, ммоль/л	25,5±3,49*	4,6±0,39	4,9±0,69
<i>HbA1c</i> , %	8,6±1,16*	3,7±0,25	3,7±0,22
Масса тела, г.	48±2,68*	19±2,26	21±2,27
Возраст 6 мес			
Глюкоза, ммоль/л	27,4±2,09*	5,7±0,65	5,4±0,38
<i>HbA1c</i> , %	8,9±1,25*	3,9±0,57	3,8±0,49
Масса тела, г.	20±2,35*	24±1,80	27±1,64

Примечание. * – *p*<0,05 по сравнению с контрольными группами ± стандартное отклонение.

Note. * – *p*<0,05 compared to control groups. ± standard deviation.

ние полиурии. На этом сроке показатели микроциркуляции снижаются, а амплитуды коферментов достоверно повышаются (НАДН=1,16±0,47; ФАД=1,51±0,44) и достоверно понижается ПОМ (ПОМ=6,26±2,36), что указывает на снижение ОВП в организме и развитие тканевой гипоксии на этом сроке (рис. 1).

С увеличением возраста у животных (2-4,5 мес) продолжает повышаться уровень гипергликемии и HbA1c (глюкозотоксичность), нарастают полиурия и полифагия, прогрессирует тяжесть нарушения физиологических функций и ОВП в организме, но еще не проявляются осложнения. Эта II стадия была названа стадией прогрессирующей дисадаптации.

В возрасте 5,0- 6,5 мес у мышей *db/db* гипергликемия достигает 27,40±2,09 ммоль/л (норма 5,70±0,65 ммоль/л; $p<0,05$), HbA1c – 8,9±1,25% (норма 3,9±0,57%; $p<0,05$); отмечаются высокие уровни коферментов: НАДН=1,42±0,75 (норма 0,65±0,01, $p<0,05$), ФАД=1,51±0,33 (норма 0,97±0,02, $p<0,05$) и крайне низкий уровень ПОМ=3,97±1,39 (норма 10,91±2,04, $p<0,05$) (рис. 1).

На этом же сроке у 30% животных в состоянии крайней степени тяжести возникала мацерация кожи, (чаще всего в области холки), которая становилась обширной незаживающей раной и оставалась у животного вплоть до его гибели. Выявление указанных признаков позволило нам считать такое состояние – III стадией развития СД2 – стадией декомпенсации адаптационных механизмов в организме, сопровождающейся возникновением тяжёлых осложнений, а также развитием тканевой гипоксии, клеточного апоптоза и некроза [8].

Выявив 3 стадии в прогрессировании метаболических нарушений при СД2, мы приступили к изучению состояния клеток крови и костного мозга в эти периоды, т.к. именно состояние и функциональные свойства этих клеток в значительной степени определяют адекватность течения ОВП в тканях организма. Нами было изучено влияние степени тяжести нарушения ОВП на показатели эритроцитов, тромбоцитов и разных типов лейкоцитов, а также клеток костного мозга, осуществляющих их продукцию.

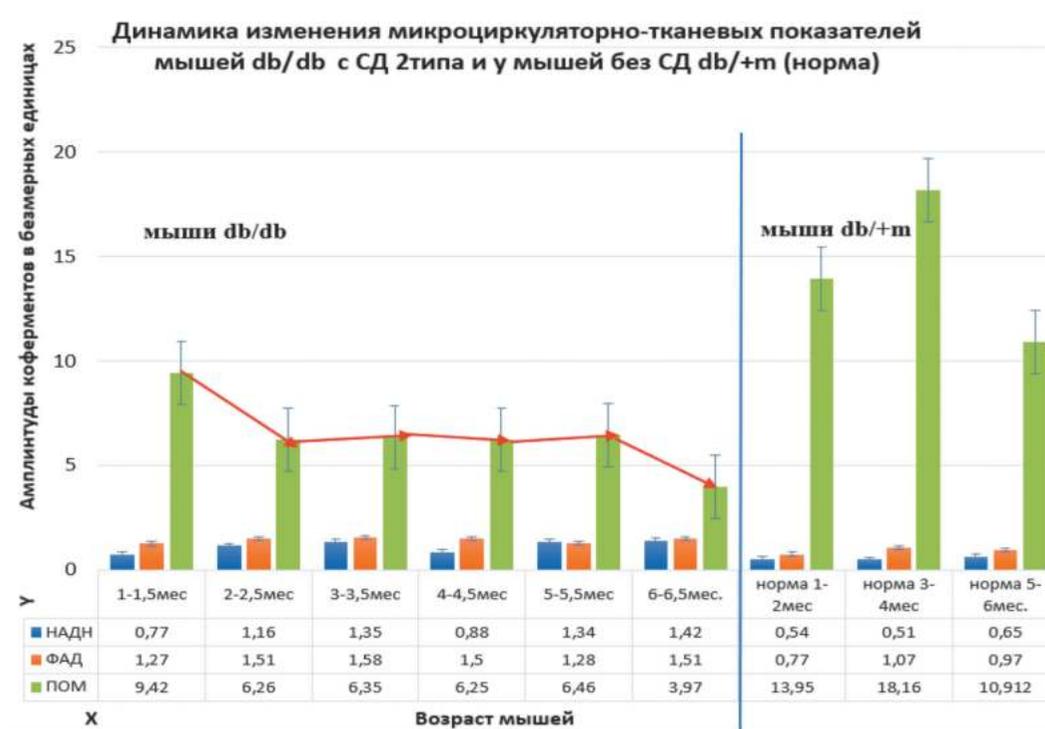


Рис. 1. Динамика изменения микроциркуляторно-тканевых показателей у мышей *db/db* с СД и у мышей без СД *db/+m* (норма) в разном возрасте (возраст мышей указан под амплитудами и измеряемых показатели: НАДН, ФАД и ПОМ). По оси координат: X – возраст мышей (месяцы); Y – амплитуды коферментов в безмерных единицах.

Fig. 1. Dynamics of changes in microcirculatory and tissue parameters in *db/db* mice with DM and in mice without DM *db/+m* (norm) at different ages (the age of mice is indicated under the amplitudes and measured indicators: NADH, FAD and POM). On the coordinate axis: X – is the age of mice (months); Y – is the amplitudes of coenzymes in immeasurable units.

В **таблице 2** представлены результаты пилотного исследования состояния эритроцитов и тромбоцитов у здоровых мышей – *db/+m* (контроль) и у мышей *db/db* (модель СД2) на разных стадиях прогрессирования СД2 (аббревиатура используемых показателей приведена в разделе «Материалы и методы»). Из **таблицы 2** видно, что уже на ранних сроках жизни мышей *db/db* (1,5 – 2,0 мес – стадия адаптации) в их крови отмечается более низкое содержание эритроцитов и сниженное содержание в эритроцитах гемоглобина по сравнению с контролем (мыши *db/+m*). Повышение RBC на стадии декомпенсации, по-видимому, является следствием сгущения крови на фоне развившейся полиурии. Кроме того, уже на раннем сроке жизни мышей *db/db* наметилась тенденция к повышению MCV, RDW-SD и тромбоцитов, а также к снижению MCHC. На этапе прогрессирующей дисадаптации, а также на этапе глубокой декомпенсации сохранялась та же тенденция к повышению или снижению отдельных характеристик эритроцитов, что по-видимому свидетельствует о развивающихся структурных изменениях эритроцитов. При исследовании тромбоцитов (PLT) отчётливо выявлено резкое увеличение количества этих клеток

в крови на этапе декомпенсации ОВП и метаболизма у мышей *db/db* (**табл. 2**).

При пилотном исследовании содержания лейкоцитов в крови (**табл. 3**) нами также было выявлено более низкое содержание общего количества лейкоцитов уже на ранних сроках жизни мышей *db/db* (1,5 – 2,0 мес) по сравнению с контролем – $5,22 \cdot 10^9/\text{л}$ против $9,92 \cdot 10^9/\text{л}$. По мере увеличения срока жизни мышей *db/db* снижение клеток белой крови прогрессировало. Кроме того, на ранних сроках жизни мышей *db/db* отмечено начинающееся повышение процентного содержания нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, а также снижение количества лимфоцитов. Эти изменения усиливались и становились отчётливо выраженными на этапах прогрессирующей дисадаптации и особенно при декомпенсации в состоянии окислительного метаболизма (**табл. 3**). Неуклонное повышение содержания тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов на фоне прогрессирующего снижения содержания лимфоцитов, а также резкое повышение относительного содержания нейтрофилов к лимфоцитам свидетельствуют об усиливающейся активации при СД2 системной воспалительной реакции и тормо-

Таблица 2/Table 2

Результаты динамического исследования состояния клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) у мышей линий *db/+m* (гетерозиготы, контроль) и *db/db* (гомозиготы, модель СД2)

Results of a dynamic study of the state of blood cells (erythrocytes and platelets) in *db/+m* mice (heterozygotes, control) and *db/db* (homozygotes, model of DM2)

Исследуемые показатели	<i>db/+m</i>		<i>db/db</i> (СД2)		
	1,5-2 мес	3-4 мес	1,5-2 мес (период адаптации)	2,5-4,5 мес (период прогрессирующей дисадаптации)	5,0-6,0-6,5 мес (период декомпенсации)
RBC $10^{12}/\text{л}$	8,68	8,36	7,5	7,73	8,12
HGB г/л	157,5	154,5	132,25	147,3	155,7
HCT %	40,75	40,35	39,15	40,8	43,88
MCV (fl)	46,95	48,25	52,15	52,8	54,18
MCH (pg)	18,1	18,45	17,6	19,07	19,18
MCHC г/л	386	383	337,25	361	354,42
RDW-CV%	15,35	13,65	18,42	17,53	17,4
RDW-SD%	27,9	25,8	38,42	36,8	37,22
PLT $10^9/\text{л}$	881	732	898	753	1044,37
MPV (fl)	6,7	6,7	6,85	6,33	6,7
PDW%	6,5	6,75	6,22	7,2	8,07
PCT%	0,59	0,49	0,61	0,48	0,69

Примечание. fl – в фемтолитрах, pg – в пикограммах.

Note. fl – in femtoliters, pg – in picograms.

жении репаративных процессов, создающих условия для развития микро- и макрососудистых осложнений.

Выявленное снижение в крови содержания эритроцитов и лейкоцитов уже на ранних сроках жизни мышей с СД2 по сравнению с контролем побудило нас изучить у этих мышей состояние костного мозга, осуществляющего процессы кроветворения в организме. Цитометрическое исследование состояния клеток костного мозга

показало (рис. 2), что у здоровых мышей *db/+m* (контроль) на сроке жизни 2 мес содержание живых клеток составило около 71,35%, а клетки в состоянии некроза, некроптоза/апоптоза и апоптоза – составили 28,65%; у мышей *db/db* на этом же сроке жизни (период адаптации) содержание живых клеток составило – 68,95%, а клетки в состоянии некроза, некроптоза/апоптоза и апоптоза суммарно составили – 31,05%. На четвер-

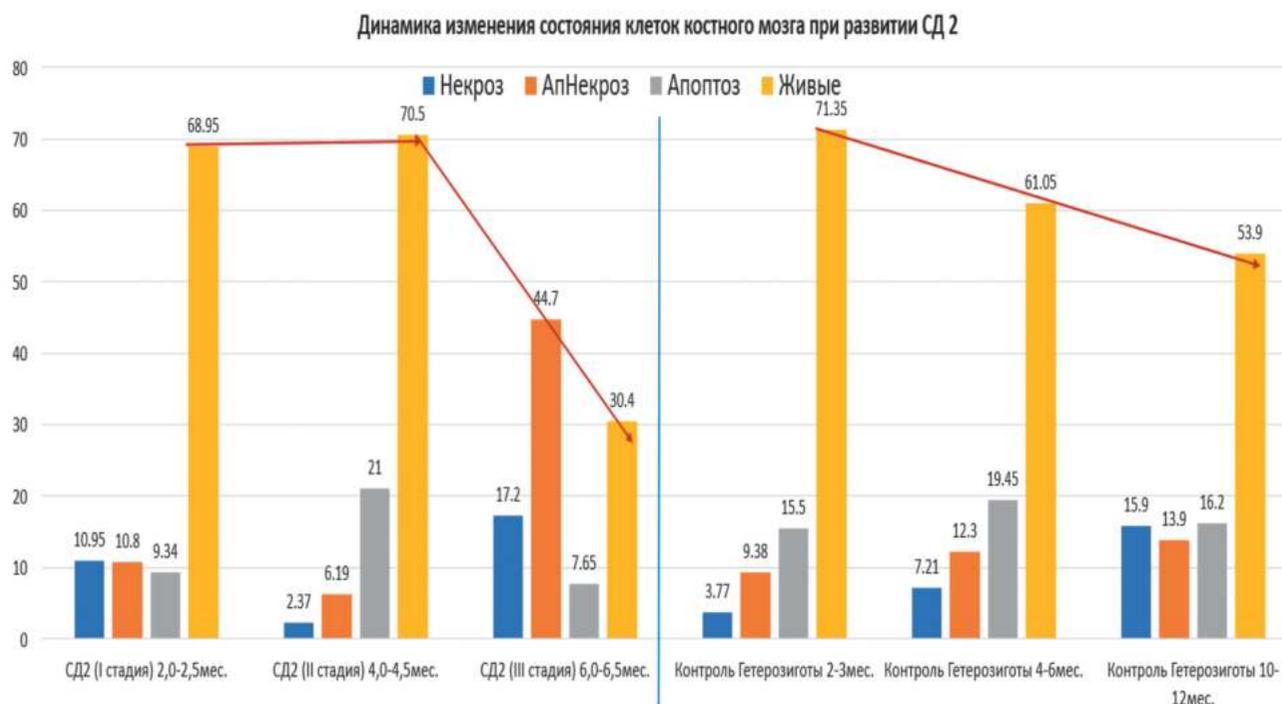


Рис. 2. Динамика изменения состояния клеток костного мозга при развитии СД 2 типа (%).

Fig. 2. Dynamics of changes in the state of bone marrow cells during the development of type 2 diabetes (%).

Таблица 3/ Table 3

Результаты динамического исследования состояния клеток крови (лейкоциты) у мышей линий *db/+m* (гетерозиготы, контроль) и *db/db* (гомозиготы, модель СД2)

Results of a dynamic study of the state of blood cells (leukocytes) in *db/+m* mice (heterozygotes, control) and *db/db* (homozygotes, model of DM2)

Исследуемые показатели	<i>db/+m</i>	<i>db/db</i> (СД2)		
	2 – 4 мес	1,5-2 мес (стадия адаптации)	2,5-4,5 мес (стадия прогрессирующей дисадаптации)	5,0-6,0-6,5 мес (стадия декомпенсации)
WBC 10 ⁹ /л	9,92	5,22	4,37	3,32
Neu %	11,2	15,95	39,83	81,9
Lymph %	87,75	81,17	56,1	9,54
Mono %	0,65	1,22	2,3	6,14
Eosi %	0,3	1,57	1,67	2,33
Baso %	0,1	0,075	0,1	0,11
Neu/Lymph	0,13	0,20	0,71	8,58

том месяце жизни (период развивающейся дисадаптации) по мере прогрессирования СД2 содержание живых клеток практически не изменилось и составило – 70,5%, а среди повреждённых клеток, которые суммарно составили – 29,5%, наибольший % составили клетки в состоянии апоптоза (21%); в период тяжёлой декомпенсации (мацерация кожи) доля живых клеток в костном мозге мышцей СД2 составила уже только 30,4%; клетки в состоянии некроза, некроптоза/апонекроза и апоптоза составили суммарно – 69,6%, причём наибольший процент повреждённых составили клетки в состоянии некроптоза/апонекроза (44,7%). Таким образом, при СД2 по мере прогрессирования метаболических нарушений и снижения эффективности ОВП в костном мозге также неуклонно нарастает угнетение процессов кроветворения, постепенно формирующих в организме различные осложнения и состояние необратимости.

Обсуждение

Проблема взаимовлияния при СД2 гипергликемии, сосудистых осложнений и состояния клеток крови и костного мозга остается недостаточно изученной. В связи с этим нами была поставлена задача – изучить в эксперименте влияние прогрессирующей тяжести нарушений тканевого метаболизма на динамику изменений в состоянии клеток крови и костного мозга, полагая, что ведущими факторами развития метаболических нарушений, в том числе при СД2, являются нарушения окислительно-восстановительных процессов (ОВП). Для изучения этой проблемы нами была использована генетическая модель СД2 на мутантных мышцах *db/db* ($n=30$). Контролем служили здоровые мыши той же линии (*db/+m*) ($n=10$) и мыши линии В 10 ($n=5$). У этих мышцей в течение 6,5 мес от момента рождения контролировали в динамике состояние клинических показателей (глюкоза в крови, содержание HbA1c% и масса тела), а также состояние ОВП (по уровню микроциркуляции в тканях, амплитудам активности НАДН, ФАД и значениям ПОМ – показатель окислительного метаболизма) неинвазивно с помощью аппарата «Лазма СТ» [12]. Развитие СД2 характеризовалось прогрессирующим развитием гипергликемии, повышением HbA1c до конца срока наблюдения (см. табл. 1). Однако в динамике изменения массы тела было выявлено 2 фазы: избыточное нарастание массы тела в течение 4 мес и последующее резкое снижение ее к 5,0 – 6,5 мес на фоне сохраняющейся гипергликемии и высокого уровня HbA1c. Этот факт указывал на развитие глубоких нарушений метаболизма и необходимость осуществления их динамического контроля. Контролируя состояние ОВП в тканях мышцей *db/db* было выявлено 3 стадии при про-

грессирующем развитии СД2 (рис. 1), которые характеризовались нарастанием во времени тяжести нарушения исследуемых показателей: I – стадия адаптации (до 2-х мес); II – стадия прогрессирующей дисадаптации (2,5 – 4,5 мес) и III – стадия декомпенсации (5 – 6,5 мес), на которой проявлялись сосудистые осложнения (30% мышцей с мацерацией кожи). Далее для решения поставленной задачи на 3-х указанных стадиях нами было выполнено пилотное исследование состояния клеток крови и костного мозга. Было установлено, что на I стадии на фоне гипергликемии и повышения HbA1c количество эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов было отчетливо сниженным и сохранялось до конца наблюдения (табл. 2). Этот факт можно объяснить тем, что гликирование белковых мембран эритроцитов и других клеток крови ведёт к снижению их отрицательного мембранного потенциала, вследствие чего развивается их ускоренное старение и сокращение срока жизни клеток крови [15]. Кроме того, снижение мембранного потенциала клеток крови при гипергликемии способствует повышению микровязкости, агрегации или адгезии этих клеток и снижает продукцию этих клеток в костном мозге [16]. В клинике снижение эритроцитов в крови у больных с СД2 отмечают при длительных сроках гипергликемии [17] и уже при наличии микрососудистых осложнений [18]. Полагают также, что снижение уровня эритроцитов м.б. следствием дефицита выработки эритропоэтина у больных с диабетической нефропатией или результатом резистентности к этому гормону, а также следствием деструкции эритроцитов, развивающейся при макро- и микроангиопатиях на длительных сроках течения СД2 [19]. Мы, однако, полагаем, что снижение количества эритроцитов и лейкоцитов в крови уже на I стадии развития генетической модели СД2 может быть связано со снижением мембранного потенциала клеток в результате раннего и ускоренного гликирования мембранных белков этих клеток, обусловленного измененной генетикой этих животных. На II стадии развития СД2 сохраняющееся снижение клеток крови может быть обусловлено всеми вышеуказанными факторами, а также происходящим повышением массы тела. Развитие тучности, как известно, сопровождается состоянием хронического воспаления и высоким уровнем циркулирующих провоспалительных цитокинов, которые, воздействуя на гемопоэтическую систему и ниши костного мозга, угнетают процессы кроветворения в них [7]. Справедливость такого мнения подтверждается нашими данными о процентном повышении содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и снижении лимфоцитов в крови (табл. 3). Повышение отношения нейтрофилов/лимфо-

цитов свидетельствует об активации системной воспалительной реакции в организме [20, 21] и даже служит в клинике предиктором ухудшения прогноза при развитии диабетической нефропатии [22, 23] и диабетических язв на ногах [24]. Полагают также, что отношение моноцитов/тромбоцитов может служить прогностическим маркером опасности развития сосудистых осложнений на II, но особенно на III стадии СД2 [25]. Наши данные по состоянию клеток костного мозга при СД2 подтверждают, что по мере прогрессирования СД2 на II стадии нарастает количество клеток в состоянии апоптоза (21%), а на III стадии среди клеток пунктата содержание живых клеток снижается до 30,4% и повышается содержание повреждённых клеток (в состоянии некроза, некроптоза/ апонекроза и апоптоза до 69,6%, причём наибольший процент приходится на клетки в состоянии некроптоза/ апонекроза – 44,7%) (рис. 2). Исследование других гематологических показателей, указанных в таблице 2, не выявило каких – либо заметных сдвигов при СД2. Однако, некоторые авторы полагают [6], что даже лёгкие отклонения их значений, могут проявить свою патологическую роль при возникновении ангиопатий, а также повлиять на функционирование гемопоэтической системы в организме при СД2.

Выводы:

1. При прогрессирующем развитии СД2 у мышей линии *db/db* выявляется 3 стадии, которые различаются по степени повышения тяжести нарушения ОВП и метаболических показателей: I – на сроке жизни 1-2 мес – стадия адаптации; II – на сроке 2,5-4,5 мес – стадия прогрессирующей дисадаптации; III – на сроке 5-6,5 мес стадия декомпенсации.

2. Прогрессирующее развитие СД2 происходит на фоне усиливающейся гликемии, увеличения содержания гликолизированного гемоглобина в эритроцитах, повышения массы тела на I и II стадии и снижения массы тела на III стадии. Эти изменения клинических показателей происходят на фоне постепенного снижения эффективности показателей ОВП (повышение амплитуд коферментов НАДН, ФАД и снижение ПОМ), особенно выраженном на III стадии.

3. При пилотном исследовании состояния клеток крови у мышей с СД2 уже на I стадии отмечается снижение содержания эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов, которое сохраняется на II и III стадии. На II и особенно на III стадии наступает резкое повышение количества тромбоцитов и процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов, а также повышение отношения нейтрофилы/лимфоциты, которое сви-

детельствуют о развитии системной воспалительной реакции.

4. В образцах костного мозга мышей *db/db* на I и II стадии сохраняется тенденция к поддержанию исходных значений живых и поврежденных клеток; на III стадии – отмечается снижение живых клеток до 30,4% и повышение поврежденных до 69,6%, преимущественно за счет клеток в состоянии апонекроза 44,7%.

5. По мере развития СД2 усиления глюкозотоксичности и снижения эффективности ОВП в организме возникает, усиливается и достигает критических значений – торможение процессов кроветворения, которое является следствием нарастающей гипоксии, прогрессирующего развития системной воспалительной реакции и свидетельствует о появлении в организме условий для возникновения макро- и микрососудистых осложнений, ускоряющих развитие состояния необратимости.

Литература

(п.п. 1–11; 13–25 см. References)

12. Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей *db/db* с помощью лазерной доплеровской флуориметрии. *Патологическая физиология экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 118–29. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129>

References

1. Artasensi A., Pedretti A., Vistoli G., Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: A review of multi – target drugs. <https://doi.org/10.3390/molecules25081987>
2. Hossain T., Kundu S., Alam S.S., Nagarajan S. Epigenetic modifications associated with the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Endocr. metab. immune disord. drug targets*. 2019; 19(6): 775–86. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190301145545>
3. Henning R.J. *Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease Future Cardiol*. 2018 Nov; 14(6): 491–509. <https://doi.org/10.2217/fca-2018-0045>. Epub 2018 Nov 9
4. Hosseini M.S., Rostami Z., Saadat A., Saadatmand SM., Naemi E. Anemia and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nephrourol Mon* 2014; 6: e19976.
5. Malandrino N., Wu W.C., Taveira T.H., Whitlatch H.B., Smith R.J. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55: 226–35.
6. Alamri B.N., Bahabri A., Alderehim A.A., Alabdujjabbar M., Alsubaie M.M., Alnaqeb D., et al. Hyperglycemia effect on red cells indices. *Eur. Rev. Med Pharmacol Sci*. 2019; 23: 2139–50. https://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17259
7. Benites B.D., Gilli S.C., Saad S.T. Obesity and inflammation and the effect on the hematopoietic system. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014; 36: 147–51.

8. Kojima H., Kim J., Chan L. Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25: 178-87.
9. Xie D., Zhao X., Chen M. Prevention and treatment strategies for type 2 diabetes based on regulating intestinal flora. *Biosci Trends*, 2021; 15(5): 313-20. <https://doi.org/10.5582/bst.2021.01275>. Epub 2021 Sep 26
10. Wu J., Yang K., Fan H., Wei M., Xiong Q. Targeting the gut microbiota and its metabolites for type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023; 14: 1114424. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1114424>. eCollection 2023
11. Ruze R., Liu T., Zou X., Chen J. S. Y., Xu R., Yin X., et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023; 14: 1161521. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1161521>. eCollection 2023
12. Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry. *Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal.* 2023; 67(2): 118-29. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129>
13. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J Vis Exp.* 2016; (110): 53936. <https://doi.org/10.3791/53936>. PMID: 27168390; PMCID: PMC4941920
14. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., Waterhouse N.J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Nov 1; 2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
15. Mazzanti L., Faloia E., Rabini R.A., Staffolani R., Kantar A., Fiorini R., et al. Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process. *Clin Biochem.* 1992; 25: 41-6.
16. Nada A.M. Red cell distribution width in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2015; 8: 525-33.
17. Verma M., Paneri S., Badi P., Raman P.G. Effect of increasing duration of diabetes mellitus type 2 on glycated hemoglobin sensitivity. *Indian J. Clin. Biochem.* 2006; 21: 142-6.
18. Wang Z.S., Song Z.C., Bai J.H., Li F., Wu T., Qi J., Hu J. Red blood cell count as an indicator of microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Vasc. Health Risk Manag.* 2013; 9: 237-43.
19. Kimura T., Kaneto H., Kanda-Kimura Y., Shimoda M., Kamei S., Anno T., et al. Seven-year observational study on the association between glycemic control and the new onset of macroangiopathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Intern. J. Med.* 2016; 55: 1419-24. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.4952>
20. Sharif-Askari F.S., Sharif-Askari N.S., Guella A., Alabdullah A., AlSheleh H.B., AlRawi A.M.H., et al. Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Urine IL-8 Levels Predict the Type of Bacterial Urinary Tract Infection in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Infect Drug Resist.* 2020; 13: 1961-70. <https://doi.org/10.2147/IDR.S251966>. eCollection 2020
21. He J., Bian X., Song C., Zhang R., Yuan S., Yin D., Dou K. High neutrophil to lymphocyte ratio with type 2 diabetes mellitus predicts poor prognosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a large-scale cohort study. *Cardiovasc Diabetol.* 2022; 21(1): 156. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01583-9>
22. He X., Qi S., Zhang X., Pan J. The relationship between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and diabetic retinopathy in adults from the United States: results from the National Health and nutrition examination survey. *BMC Ophthalmol.* 2022; 22(1): 346. <https://doi.org/10.1186/s12886-022-02571-z>
23. Darwish N.M., Elnahas Y.M., Al Qahtany F.S. Diabetes induced renal complications by leukocyte activation of nuclear factor κ -B and its regulated genes expression. *Saudi J Biol Sci.* 2021; 28(1): 541-9. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.039>. Epub 2020 Oct 29
24. Arican G., Kahraman H.Ç., Özmeriç A., İltar S., Alemdaroğlu K.B. Monitoring the prognosis of diabetic foot ulcers: predictive value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width int. *J Low Extrem Wounds.* 2020; 19(4): 369-76. <https://doi.org/10.1177/1534734620904819>. Epub 2020 Feb 10
25. Tay H.M., Yeap W.H., Dalan R., Wong S.C., Hou H.W. Multiplexed label-free fractionation of peripheral blood mononuclear cells for identification of monocyte-platelet aggregates. *Anal Chem.* 2018; 90(24): 14535-42. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04415>

Сведения об авторах:

Степанова Ольга Ивановна, канд. биол. наук, зав. лаб. № 5, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: olgsima50@mail.ru;

Клёсов Роман Алексеевич, науч. сотр., лаб. № 5, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: klesrom@mail.ru;

Семёнов Хызыр Хысаевич, канд. биол. наук, зав. лаб. № 10, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России;

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП;

Черепов Антон Борисович, науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

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

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Онищенко Нина Андреевна, доктор мед. наук, проф., гл. специалист отд-ния подготовки научных и медицинских кадров ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Никольская Алла Олеговна, канд. биол. наук, лаборант-исследователь, отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии, ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Басок Юлия Борисовна, доктор мед. наук, зав. отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 57.044

Панова Э.В.^{1,2}, Зыкина Н.С.¹, Илюха В.В.¹

Биологическое действие экстракта листьев стевии на обменные процессы мышей C57BL/6

¹Петрозаводский государственный университет,
185910, Петрозаводск, Россия, пр. Ленина, д. 33;

²Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
185910, Петрозаводск, Россия, ул. Пушкинская, д. 11

Цель исследования – изучение влияния хронического употребления экстракта листьев стевии (ЭЛС, *Stevia rebaudiana* Bertoni), широко применяемой как сахарозаменитель, на биохимические показатели крови и состояние внутренних органов половозрелых самок мышей (*Mus musculus domesticus*) линии C57BL/6.

Методика. Животные были разделены на 3 группы: контрольную и 2 опытных, получавших водный раствор экстракта листьев стевии по 1 (допустимая суточная доза – ДСД) и 10 мг/г массы тела соответственно в течение 2-х мес.

Результаты. Показано повышение общего холестерина, снижение триацилглицеридов (ТАГ) и глюкозы крови, без дозозависимого эффекта. Установлено снижение массы поджелудочной железы и печени, а также сердца исключительно в группе получавшей ДСД экстракта. В этой же группе наблюдалось увеличение массы почек и селезенки. Кроме того прием экстракта приводил к изменению цвета почек, селезенки и печени, а в некоторых случаях к гидронефротическим изменениям почек.

Заключение. Таким образом, хроническое употребление ЭЛС оказывает как положительный, так и отрицательный эффект, что обуславливает необходимость более точного определения ДСД экстракта.

Ключевые слова: экстракт листьев стевии (ЭЛС); холестерин; триацилглицериды (ТАГ); общий белок; глюкоза крови

Для цитирования: Панова Э.В., Зыкина Н.С., Илюха В.В. Биологическое действие экстракта листьев стевии на обменные процессы мышей C57BL/6. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 109-113.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.109-113

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Зыкина Н.С., Илюха В.В.; сбор и обработка материала – Панова Э.В., Зыкина Н.С., Илюха В.В.; подготовка иллюстративного материала – Панова Э.В.; статистическая обработка материала – Илюха В.В.; написание текста и редактирование – Зыкина Н.С., Илюха В.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Илюха Владимир Викторович, e-mail: karax911@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.12.2023

Принята в печать 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Panova E.V.^{1,2}, Zykina N.S.¹, Ilyukha V.V.¹

The biological effect of stevia leaf extract on metabolic processes in C57BL/6 mice

¹Petrozavodsk State University,
33 Prospekt Lenina, Petrozavodsk, 185910, Russian Federation;

²Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk, 185910, Russian Federation

Aim: To study the effect of chronic treatment with stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaf extract (SLE), that is widely used as a sweetener, on blood biochemistry and the state of internal organs in sexually mature C57BL/6 female mice (*Mus musculus domesticus*).

Methods. Animals were divided into three groups: a control group and two experimental groups. The mice received a SLE water solution at doses of one (permissible daily dose, PDD) and 10 mg/g of body weight, respectively, for two months.

Results. The study showed an increase in total cholesterol and decreases in triacylglycerols and blood glucose without a dose-dependent effect. Decreases in the weight of the pancreas, liver, and heart were observed only in the group receiving the SLE at PDD. In the same group, increases in the weight of the kidneys and spleen were observed. Also, the SLE treatment resulted in discoloration of the kidneys, spleen and liver, and, in some cases, hydronephrotic changes in the kidneys.

Conclusion. Thus, the chronic treatment with the SLE had both positive and negative effects, which necessitates a more accurate determination of the SLE PDD.

Keywords: stevia leaf extract; cholesterol; triacylglycerols (TAGs); total protein; blood glucose

For citation: Panova E.V., Zykina N.S., Ilyukha V.V. The biological effect of stevia leaf extract on metabolic processes of C57BL/6 mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 109-113. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.109-113

Author's contribution: concept and design of the study – Zykina N.S., Ilyukha V.V.; collection and processing of material – Panova E.V., Zykina N.S., Ilyukha V.V.; preparation of illustrative material – Panova E.V.; statistical processing – Ilyukha V.V.; text writing and editing – Zykina N.S., Ilyukha V.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Vladimir V. Ilyukha, e-mail: karax911@mail.ru

Information about the authors:

Panova E.V., <https://orcid.org/0009-0003-1124-3489>

Zykina N.S., <https://orcid.org/0009-0005-7736-734X>

Ilyukha V.V., <https://orcid.org/0000-0002-2371-1740>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 14.12.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

В последнее время некоторые национальные организации здравоохранения рекомендуют снизить потребление глюкозы, используя некалорийные заменители. Это связано с резким ростом потребления сахаров и негативного влияния глюкозы, в частности с усилением выделения инсулина, ростом аппетита и увеличением веса, провоцирующими развитие сахарного диабета. Одним из востребованных сегодня натуральных веществ, способных заменить сахарозу, являются гликозиды растения *Stevia rebaudiana* Bertoni. Свою популярность экстракт из растения приобрёл благодаря интенсивной сладости (в 250-300 раз слаще сахарозы) и некалорийности. Помимо этого, после употребления стевииозидов не происходит выброса инсулина в кровь, что позволяет снизить инсулинозависимым диабетикам дозы принимаемого инсулина. Данные исследований, затрагивающие влияние стевииозидов на метаболизм, являются противоречивыми. С одной стороны, можно выделить результаты, содержащие информацию о его безопасности и пользе для людей с диабетом, ожирением, а также для тех, кто намеривается похудеть или сократить приём сахара [1]. Кроме того экстракт листьев стевии обладает противораковой активностью. С другой стороны – имеются исследования, свидетельствующие о негативном влиянии экстракта на различные показатели репродуктивной и нервной систем, состояния почек, обменных процессов и др. [2]. Таким образом, вышеизложенная противоречивость информации о влиянии стевииозидов на организм требует более детального рассмотрения его влияния на обменные процессы.

Методика

Исследования выполнены на научном оборудовании кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института Петрозаводского государственного университета (ПетрГУ) в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным, 64 редакция 2013 г. и директивой европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей [3, 4]. Дизайн исследования одобрен комитетом по медицинской этике при Министерстве здравоохранения РК и Петрозаводском государственном университете. Опыты проводили на половозрелых самках мышей линии C57BL/6 содержащихся в виварии ПетрГУ.

Всего в эксперименте было задействовано 180 мышей линии C57BL/6 (*Mus musculus domesticus*) в возрасте от 1,5 мес. Экспериментальные животные получали экстракт листьев стевии «Стевиозид» производства ООО «Витачай» (ТУ 9197-008-65182242-12 с изменением № 1) с водой в различных концентрациях: допустимая суточная доза (ДСД, 1 мг/г массы тела); допустимая суточная доза, превышенная в 10 раз (10 мг/г массы тела); контрольная группа получала очищенную воду.

Допустимая суточная доза является минимальной, не оказывающей негативного эффекта дозировкой вещества, определяется в основном на мелких грызунах [5]. В случае с пищевыми добавками для использования человеком вводится дополнительный, уменьшающий ее коэффициент. Таким образом, увеличив, рекомендованную производителем, максимальную дозировку препарата на коэффициент безопасности, была определена ДСД для экспериментальных животных.

После 60 дней хронического употребления ЭЛС животных выводили из эксперимента, проводили отбор и измерение массы образцов для проведения биохимических исследований. Уровни содержания глюкозы, общего белка, триглицеридов и холестерина определяли с использованием наборов производства «ЭКО-сервис» (Санкт-Петербург) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, с использованием ПО MS Excel и Statgraphics. Различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$. Скореллированность изменений показателей оценивали с помощью критерия Пирсона.

Результаты

В рамках исследования была проведена оценка биохимических показателей крови половозрелых самок мышей линии C57BL/6 получавших различную до-

зу экстракта листьев стевии. Употребление экстракта листьев стевии, вне зависимости от дозы, достоверно повышало уровень холестерина. При этом наблюдалось значимое снижение уровня ТАГ (рис. 1). Достоверное увеличение уровня глюкозы крови, наблюдаемое у мышей, не имеет дозозависимого эффекта. В ходе исследования не было обнаружено достоверных изменений общего уровня белка.

В ходе исследования было отмечено изменение веса ряда органов. Вес печени и поджелудочной железы достоверно снижался при приеме экстракта без дозозависимого эффекта, а вес сердца снижался достоверно лишь при приеме допустимой суточной дозы. Хронический прием ЭЛС превышающий допустимую суточную дозу в 10 раз, так же приводил к достоверному увеличению веса почек и селезенки. Немаловажно, что ЭЛС вызывал у экспериментальных животных изменения в почках, схожие с гидронефрозом, кроме того наблюдалось изменение окраса селезенки, печени и почек в опытных группах (см. табл.). Статистически значимого влияния экстракта

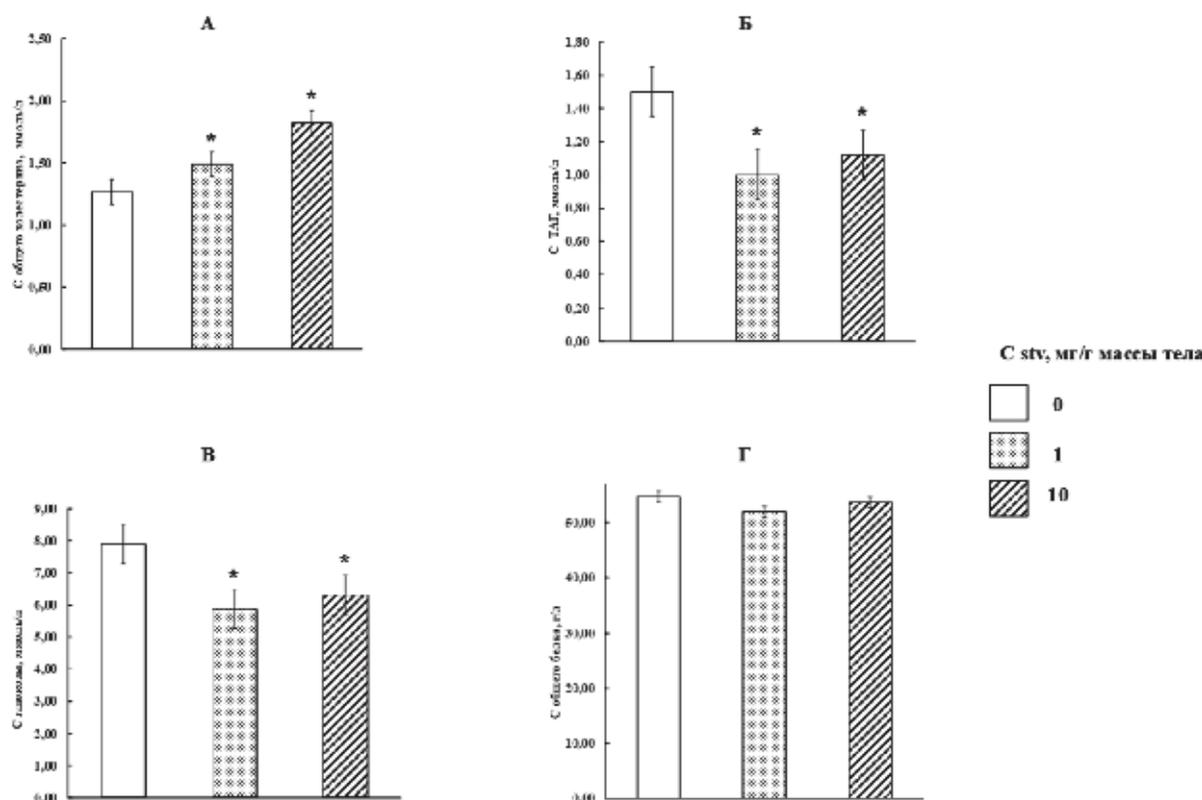


Рис. 1. Содержание глюкозы, общего белка, триглицеридов и холестерина в крови мышей линии C57BL/6 при хроническом употреблении различных доз экстракта листьев стевии. * – показатель достоверно отличается от контрольной группы.

Fig. 1. Blood glucose, total protein, triglycerides and cholesterol content of C57BL/6 mice during chronic administration of different doses of stevia leaf extract. * – the index is significantly different from the control group.

листьев стевии при хроническом приеме на вес легких выявлено не было.

При употреблении животными экстракта листьев стевии отмечалась в разной степени выраженная скоррелированность изменений изученных показателей (рис. 2). Независимо от дозировки ЭЛС появляется прямая корреляция массы печени с содержанием глюкозы в крови экспериментальных животных. Важно, что при десятикратном превышении ДСД образуются замкну-

тые циклы положительных корреляций, в которые вовлечен уровень глюкозы крови, что может являться предпосылкой наблюдаемых патологических изменений.

Часть изменений изученных показателей являются вполне предсказуемыми и являются положительными с точки зрения протекторного действия стевियोзида. В частности, снижение уровня ТАГ стоит считать положительным, так как повышение его содержания на 0,26 ммоль/л увеличивает риск развития сахарного диабета

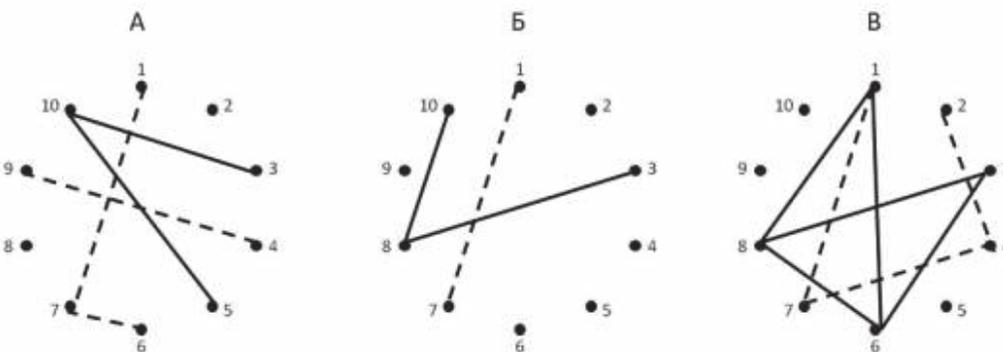


Рис. 2. Корреляционные плеяды контрольной (А), группы потреблявшей 1(Б) и 10(В) мг ЭЛС/г массы тела; корреляции в парах весовых характеристик $n=45$, биохимических характеристик $n=5$; $p<0,05$.

1 – масса животного, 2 – масса сердца, 3 – масса печени, 4 – масса почек, 5 – масса легких, 6 – масса селезенки, 7 – масса поджелудочной железы, 8 – уровень глюкозы крови, 9 – уровень ТАГ крови, 10 – уровень общего белка крови, коэф. коррел. положительный – сплошная линия, коэф. коррел. отрицательный – пунктирная линия.

Fig. 2. Co-relationships of control (A), group consuming 1(B) and 10(C) mg ELC/g body weight; correlations in pairs of weight characteristics $n=45$, biochemical characteristics $n=5$; $p<0,05$.

1 – animal weight, 2 – heart weight, 3 – liver weight, 4 – kidney weight, 5 – lung weight, 6 – spleen weight, 7 – pancreas weight, 8 – blood glucose level, 9 – blood TAG level, 10 – total blood protein level, coefficient of correlations positive – solid line, coefficient of correlations negative – dashed line.

Масса внутренних органов мышей линии C57BL/6 при хроническом употреблении различных доз экстракта листьев стевии
Internal organ weights of C57BL/6 mice during chronic consumption of different doses of stevia leaf extract

C stv, мг/г массы тела C stv, mg/g body weight	0	1	10
Сердце, г Heart, g	0,144 ± 0,038	0,096 ± 0,001*	0,146 ± 0,030♦
Печень, г Liver, g	1,091 ± 0,015	0,924 ± 0,047*	0,962 ± 0,041*
Почки, г Kidneys, g	0,282 ± 0,005	0,267 ± 0,007	0,463 ± 0,041*♦
Лёгкие, г Lungs, g	0,167 ± 0,010	0,159 ± 0,005	0,164 ± 0,006
Селезёнка, г Spleen, g	0,077 ± 0,003	0,075 ± 0,002	0,083 ± 0,002*♦
Поджелудочная железа, г Pancreas, g	0,291 ± 0,009	0,181 ± 0,013*	0,192 ± 0,008*

Примечание. * – группа достоверно отличается от контрольной; ♦ – группа достоверно отличается от получавшей допустимую суточную дозу экстракта листьев стевии (1мг/г массы тела).

Note. * – group is significantly different from the control group; ♦ – group is significantly different from the group that received the permissible daily dose of stevia leaf extract (1mg/g body weight).

на 4% [6]. Вероятной причиной снижения уровня ТАГ является стимуляция активности ферментов липазы, вырабатываемых печенью [7]. Немаловажно что в литературе имеются противоречивые данные о динамике этого показателя [7, 8]. Аналогично, к позитивным изменениям следует отнести и снижение уровня глюкозы крови. Полученные данные согласуются с данными мировых исследований [9]. Причиной изменения полагают снижение экспрессии гена PEPCK в печени под действием стевиозида, что в итоге замедляет глюконеогенез [9]. Применение экстракта листьев стевии имеет положительный эффект у людей, страдающих сахарным диабетом 2 типа, а так же в целом, снижает риск острого инфаркта миокарда [10]. К негативному влиянию ЭЛС, помимо патологических изменений селезенки, печени и почек, следует отнести и достоверное увеличение общего холестерина крови. В литературе имеются данные как соответствующие полученным в ходе работы [7], так и противоречащие им [11–13]. Повышение уровня холестерина является однозначно негативным фактором, так как приводит к увеличению риска ишемической болезни сердца [14].

Заключение

Суммируя всё вышеизложенное, можно утверждать, что экстракт листьев стевии в целом оказывает благоприятное воздействие на биохимические показатели крови, но при этом негативно влияет на состояние ряда внутренних органов, что не позволяет сделать заключение о безопасности применения данного вещества в качестве пищевой добавки даже в разрешённой концентрации. Различия данных, встречающихся в литературе, могут быть связаны с видовой специфичностью, что дополнительно ставит вопрос о допустимости использования исключительно животных моделей для определения безопасной дозы вещества для организма человека [2, 15].

Литература

(п.п. 1-2; 4-15 см. References)

3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Страсбург, 2010.

References

1. Geuns J.M., Buyse J., Vankeirsbilck A., Temme E.H. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental biology and medicine*. 2007; 232(1): 164–73. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-2320164>

2. Latarissa I.R., Barliana M.I., Lestari K.A. Comprehensive review of stevia rebaudiana Bertoni effects on human health and its mechanism. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2020; 10: 91–5.
3. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Strasbourg, 2010.
4. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013; 310(20): 2191–4. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
5. Walton K., Walker R., Van De Sandt J.J.M., Castell J.V., Knapp A.G.A.A., Kozianowski G. The application of in vitro data in the derivation of the acceptable daily intake of food additives. *Food and Chemical Toxicology*. 1999; 37(12): 1175–97. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00107-6)
6. Beshara A., Cohen E., Goldberg E., Lilos P., Garty M., Krause I. Triglyceride levels and risk of type 2 diabetes mellitus: a longitudinal large study. *Journal of Investigative Medicine*. 2016; 64(2): 83–385. <https://doi.org/10.1136/jim-2015-000025>
7. Ahmad U., Ahmad R.S., Arshad M.S., Mushtaq Z., Hussain S.M., Hameed A. Antihyperlipidemic efficacy of aqueous extract of Stevia rebaudiana Bertoni in albino rats. Lipids in health and disease. 2018; 17: 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0810-9>
8. Farid A., Hesham M., El-Dewak M., Amin A. The hidden hazardous effects of stevia and sucralose consumption in male and female albino mice in comparison to sucrose. *The Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020; 28(10): 1290–300. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.08.019>
9. Chen T., Chen S., Chan P., Chu Y., Yang H., Cheng J. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of stevia rebaudiana. *Planta Med*. 2005; 71(2): 108–13. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837775>
10. Stranders I., Diamant M., van Gelder R.E., Spruijt H.J., Twisk J.W., Heine R.J., et al. Admission blood glucose level as risk indicator of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2004; 164(9): 982–8. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.9.982>
11. Barriocanal L.A., Palacios M., Benitez G., Benitez S., Jimenez J.T., Jimenez N., et al. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2008; 51: 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.02.006>
12. Hsieh M., Chan P., Sue Y., Liu J., Liang T.H., Huang T., et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics*. 2003; 25(11): 2797–808. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)80334-X](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)80334-X)
13. Jeppesen P., Barriocanal L., Meyer M., Palacios M., Canete F., Benitez S., et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with type 2 diabetes: A long-term, randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *Diabetologia*. 2006; 49(1): 511–2.
14. Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Cholesterol, diabetes and major cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Diabetologia*. 2007; 50: 2289–97. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0801-2>
15. Panpatil V.V., Polasa K. Assessment of stevia (Stevia rebaudiana)-Natural sweetener: A review. *Journal of Food Science and Technology*. 2008; 45(6): 467.

Сведения об авторах:

Панова Элина Валерьевна, бакалавр, вед. биолог, лаб. экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН;
Зыкина Наталья Сергеевна, канд. биол. наук, доцент каф. биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института ПетрГУ;
Илюха Владимир Викторович, канд. биол. наук, доцент каф. биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института ПетрГУ.

Методика

© Коллектив авторов, 2024

УДК 578.088.8

Маковеева К.А.¹, Егорова Б.В.^{1,2}, Коков К.В.¹, Артюхов А.А.¹, Кузнецова Т.М.¹, Курочкин А.В.¹, Ершов А.О.³, Касацкий П.С.³, Коневега А.Л.³, Рыбакова А.В.³, Трашков А.П.¹, Колотаев А.В.¹, Осипов В.Н.¹, Хачатрян Д.С.¹, Чувилин Д.Ю.¹, Гончаров Н.Г.¹

Создание радиофармацевтической транспортной конструкции для диагностики и терапии ревматоидных артритов

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия, пл. Академика Курчатова, д. 1;

²ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1;

³ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Россия, мкр. Орлова роща, д. 1

Введение. Проведен синтез конъюгата, состоящего из метотрексата и бифункционального хелатирующего агента. Подобное соединение отличается свойством таргетности по отношению к очагам аутоиммунных артритов. **Цель работы** – синтезировать комплекс, содержащий радионуклид лютеций-177, для терапии аутоиммунных артритов.

Методика. После проведения синтеза радиохимическую чистоту полученного препарата определяли методом тонкослойной хроматографии. В исследованиях *in vivo* в качестве тест-системы были задействованы аутбредные крысы, самцы в количестве 12 особей. Перед началом исследования животные были распределены на контрольную группу и исследуемую по биораспределению. Исследование биораспределения радиокомплекса производилось общепринятым способом прямой радиометрии. Оценка производилась путем прямого сравнения распределения радиофармацевтического препарата в крови и органах животных. С учетом периода полураспада радионуклида ¹⁷⁷Lu исследования в контрольных точках при изучении фармакокинетики и биораспределения тестируемых препаратов оценивалось не менее 3 особей животных.

Результаты. Радиохимическая чистота синтезированного препарата составила не менее 95%. Исследования биораспределения показали тенденции к накоплению препарата в ткани почек, сердца, легких, в остальных оцениваемых органах и тканях накопление препарата имело умеренный и транзитный характер. Терапевтический радиофармацевтический препарат продемонстрировал удовлетворительный уровень эффективности в отношении целевой нозологии: отмечалось клинически значимое улучшение и частичное восстановление функций пораженной конечности.

Заключение. Результаты исследования могут быть внедрены в практику научной работы по разработке лекарственных средств и средств медицинского применения и являются основанием для проведения расширенного углубленного исследования и оптимизации механизмов таргетного действия исследуемых в данной работе радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Ключевые слова: аутоиммунный артрит; лютеций-177; радиосиноэктомия; таргетная терапия; метотрексат

Для цитирования: Маковеева К.А., Егорова Б.В., Коков К.В., Артюхов А.А., Кузнецова Т.М., Курочкин А.В., Ершов А.О., Касацкий П.С., Коневега А.Л., Рыбакова А.В., Трашков А.П., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С., Чувилин Д.Ю., Гончаров Н.Г. Создание радиофармацевтической транспортной конструкции для диагностики и терапии ревматоидных артритов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 114-125.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.1.114-125

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гончаров Н.Г., Коневега А.Л., Трашков А.П.; сбор и обработка материала – Маковеева К.А., Егорова Б.В., Коков К.В.; проведение биологических исследований – Ершов А.О., Касацкий П.С., Рыбакова А.В.; проведение химических исследований – Колотаев А.В., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С.; написание текста – Чувилин Д.Ю., Артюхов А.А., Кузнецова Т.М.; редактирование – Курочкин А.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Коков Константин Владимирович, e-mail: kvkokov@yandex.ru

Финансирование. Работы выполнены при финансовой поддержке Частного учреждения по обеспечению развития атомной отрасли «Наука и инновации» (Росатом) в рамках договора №774/164-D/651/ККФХТ «Создание радиофармацевтической транспортной конструкции на основе аутоиммунных комплексов для диагностики и терапии аутоиммунных артритов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.11.2023

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Makoveeva K.A.¹, Egorova B.V.^{1,2}, Kokov K.V.¹, Artyukhov A.A.¹, Kuznetsova T.M.¹, Kurochkin A.V.¹, Ershov A.O.³, Kasatsky P.S.³, Konevega A.L.³, Rybakova A.V.³, Trashkov A.P.¹, Kolotaev A.V.¹, Osipov V.N.¹, Khachatryan D.S.¹, Chuvilin D.Yu.¹, Goncharov N.G.¹

Synthesis of a radiopharmaceutical for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis

¹National Research Centre Kurchatov Institute,

1 Ploshchad Akademika Kurchatova, Moscow, 123182, Russian Federation;

²Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

³Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Kurchatov Institute Naional Research Center,

1 Orlova Roshcha, Gatchina Microdistrict, Leningrad Region, 188300, Russian Federation

Background. A conjugate consisting of methotrexate and a bifunctional chelating agent was synthesized. This compound is distinguished by its ability to target foci of autoimmune arthritis.

Aim. To synthesize a radionuclide ¹⁷⁷Lu-based complex for the treatment of autoimmune arthritis.

Methods. After synthesis, the radiochemical purity of the complex was determined by thin layer chromatography. In the *in vivo* study, 12 outbred male rats were used as a test system. Prior to the biodistribution study, the animals were divided into a control group and a study group. The radioconjugate biodistribution was assessed with the generally accepted method of direct radiometry by direct comparison of radiopharmaceutical distribution in blood and organs. Taking into account the ¹⁷⁷Lu half-life, at least three animals were assessed at measurement points when studying the radiopharmaceutical pharmacokinetics and biodistribution.

Results. The radiochemical purity of the ¹⁷⁷Lu-based complex was no less than 95%. Biodistribution studies showed a tendency towards radioactivity accumulation in the kidneys, heart, and lungs. In the remaining assessed organs and tissues, the radioactivity accumulation was moderate and transient. The therapeutic radiopharmaceutical demonstrated a satisfactory effectiveness in relation to the target nosology, autoimmune arthritis, evident as clinically significant improvement and partial restoration of the functions of the affected limb.

Conclusion. The results of the study can be implemented in the practice for the development of drugs and medical devices and justify conducting an expanded study and optimizing the mechanisms for targeted action of the radiopharmaceuticals, such as studied in the present work.

Keywords: autoimmune arthritis; lutetium-177; radiosynovectomy; targeted therapy; methotrexate

For citation: Makoveeva K.A., Egorova B.V., Kokov K.V., Artyukhov A.A., Kuznetsova T.M., Kurochkin A.V., Ershov A.O., Kasatsky P.S., Konevega A.L., Rybakova A.V., Trashkov A.P., Kolotaev A.V., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Chuvilin D.Yu., Goncharov N.G. Synthesis of radiopharmaceutical for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 114-125. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.1.114-125

Authors' contribution: concept and design of the study – Goncharov N.G., Konevega A.L., Trashkov A.P.; collection and processing of material – Makoveeva K.A., Egorova B.V., Kokov K.V.; biological study – Ershov A.O., Kasatsky P.S., Rybakova A.V.; chemical research – Kolotaev A.V., Osipov V.N., Khachatryan D.S.; writing the text – Chuvilin D.Yu., Artyukhov A.A., Kuznetsova T.M.; editing the text – Kurochkin A.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Konstantin V. Kokov, e-mail: kvkokov@yandex.ru

Financing. This work was carried out with the financial support of the Private Institution for the Development of the Nuclear Industry "Science and Innovation" (Rosatom) under contract No. 774/164-D/651/KKFHT.

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

Received 17.11.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Радиосиноэктомия – радиоизотопный метод лечения воспалительных заболеваний суставов с доказанной эффективностью [1]. При введении радиоактивного вещества в сустав происходит воздействие на синовиальную оболочку сустава, что ведет к формированию ее поверхностного фиброза и стойкому подавлению воспаления. Метод является альтернативой хирургической синоэктомии и предназначен для местного лечения практически всех видов хронических синовитов, за исключением инфекционного. Традиционное лечение ревматических заболеваний основано на низких дозах препарата метотрексат – цитостатического препарата из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты [2-4]. Согласно рекомендациям Европейского альянса ассоциаций ревматологов, базисным противовоспалительным препаратом первой линии при этом является метотрексат [5].

Целью проведенных исследований являлась разработка, синтез и исследование препарата для таргетной радионуклидной терапии аутоиммунных (ревматоидных) артритов – конъюгата состава вектор-хелатор-радионуклид. Препарат представляет собой синтетическую конструкцию, состоящую из бифункционального хелатирующего агента (БФХА), конъюгированного с молекулой метотрексата. Посредством присоединенного к аутоиммунному комплексу хелатора DOTA конструкция нагружена β -излучающим радионуклидом ^{177}Lu .

Использование радиоактивно меченных агентов с метотрексатом в качестве инструмента для раннего обнаружения и визуализации воспаления у пациентов с ревматоидным артритом дало многообещающие результаты [6-9]. В этой связи использование метотрексата может найти применение не только в непосредственно диагностических, но и в тераностических подходах. Так, конъюгат, обладающий сродством к фолатным рецепторам на активированных макрофагах, может использоваться для визуализации и адресной терапии аутоиммунного (ревматоидного) артрита. Преимущество такого подхода заключается в том, что метотрексат в конъюгате является не только вектором, доставляющим радионуклид к мишени, но и лекарственным агентом.

Цель исследования – создание перспективного радиофармацевтического таргетного препарата для терапии аутоиммунных артритов, обладающего комбинированным действием веществ на патологический очаг, в результате чего суммарный эффект будет превышать действие, оказываемое на подобный очаг каждым компонентом в отдельности.

Методика

Все реактивы для синтеза получены от Acros Organics, ABCR, Sigma-Aldrich и использовались без дополнительной очистки. Спектры ЯМР регистрировали на Фурье ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III NanoBay 300 МГц (спектры регистрировали в режиме стабилизации по дейтерию, термостабилизация 25°C , внутренний стандарт – тетраметилсилан) в ДМСО- d_6 . Химические сдвиги приведены в миллионных долях (δ), КССВ – в герцах. Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографической системе Agilent LC/MS 1200, с использованием колонки Reprosil – Pur Basic C18 (5 мкм), 4.6×240 мм, подвижная фаза: буфер А – 0.1% TFA в воде, буфер Б – 0.1% TFA в ацетонитриле, элюирование градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 5 до 100% за 20 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Соединения очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на установке, состоящей из двух насосов «GILSON 306» производительностью до 25 мл/мин, манометрического модуля «GILSON 805» и спектрофотометрического детектора UVV-105 («JET chrom»). Разделение проводили на колонке ReproSil-Pur AQ C18 (5 мкм) размером 250×10 мм с предколонкой ReproSil-Pur AQ C18 (10 мкм) размером 30×8 мм. Элюент – водный ацетатно-аммонийный буфер (pH 5)/MeCN (3:2). Масс-спектры ионизации электрораспылением (ИЭР) получены на масс-спектрометре amaZon Bruker Daltonics с ионной ловушкой. Измерение проводилось в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне m/z от 70 до 2200. Напряжение на капилляре распылителя составляло – 4500 В. В качестве газа-носителя использовался азот с температурой 100°C и расходом 6 л/мин. В качестве элюента использовали раствор состава ацетонитрил + ТФУ (0.01%) со скоростью потока 0.3 мл/мин (хроматограф Thermo Scientific UltiMate 3000). Анализируемый образец растворяли в ацетонитриле + ТФУ (0.01%) до концентрации 0.5–1 г/л. Ввод образца в поток производился через автосемплер. Объем вкальваемой пробы 2 мкл. Полноту протекания реакций контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах TLC Silicagel 60 F254, элюент – хлороформ/метанол 3:1.

Для синтеза конъюгата выбран и апробирован метод, в котором метотрексат соединен с бифункциональным хелатирующим агентом DOTA через этилендиаминный линкер EDA – (DOTA-EDA-MTX). На первом этапе проводится синтез промежуточного производного DOTA с этилендиамином ((t-Bu) $_3$ DOTA-EDA (3)) через амидирование метилового или этилового

го эфира ((t-Bu)₃DOTA-OAlk(2)) [10,11]. Затем проводится синтез целевого соединения по методике, описанной в работе [12]. Общая схема синтеза приведена на **рис. 1**.

На первой стадии процесса получения аминного производного **3** синтезировали DO₃A(tBu)₃ (**1**), после чего проводили реакцию алкилирования полученного **1** этилбромацетатом.

На следующей стадии реакцией аминолитиза (t-Bu)₃DOTA-OEt (**2**) этилендиамином получали соединение **3**.

Взаимодействием MTX с гидроксисукцинимидом с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC)

в качестве конденсирующего агента в диметилформамиде получали активированный сукцинимидный эфир метотрексата, к которому далее без выделения добавляли соединение **3** с получением трет-бутилового эфира конъюгата (t-Bu)₃DOTA-EDA-MTX (соединение **4**).

Трет-бутиловые эфиры удаляли обработкой соединения **4** трифторуксусной кислотой (TFA) с последующей очисткой смеси при помощи препаративной ВЭЖХ. В результате получали конъюгат (DOTA-EDA-MTX) (соединение **5**), который можно использовать для связывания с радионуклидом ¹⁷⁷Lu.

Радионуклид ¹⁷⁷Lu получали «непрямым» методом на исследовательском реакторе ИР-8 НИЦ «Курча-

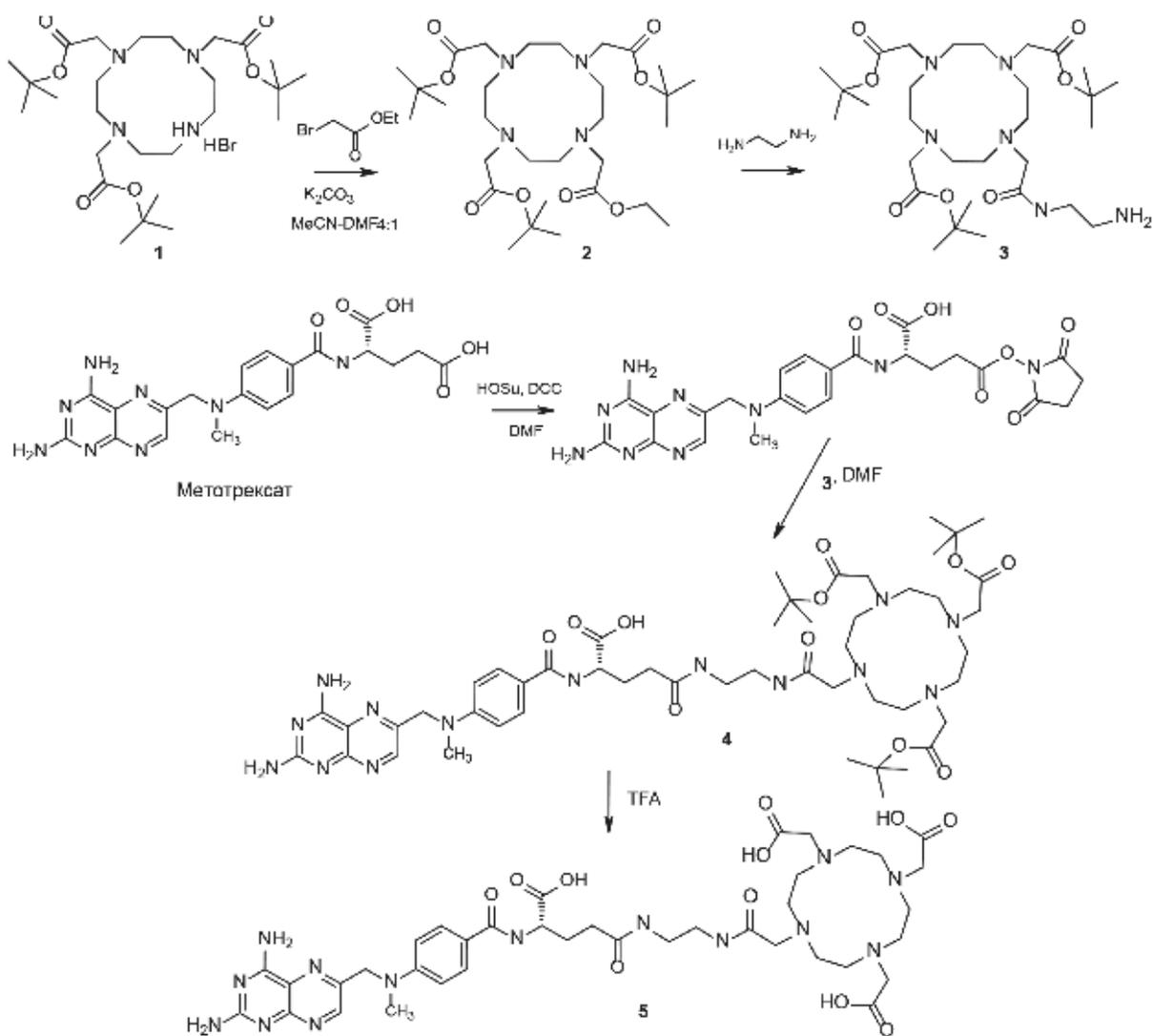


Рис. 1. Схема синтеза конъюгата (DOTA-EDA-MTX).

Fig. 1. Scheme for the (DOTA-EDA-MTX) synthesis.

товский институт» по реакции радиационного захвата $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}\rightarrow^{177}\text{Lu}$ облучением оксида иттербия Yb_2O_3 , обогащенного (99,8%) по изотопу ^{176}Yb , экспозиция 100 ч. На момент окончания облучения активность ^{177}Lu в образце $^{176}\text{Yb}_2\text{O}_3$ массой 111 мг составила $(1,36\pm 0,1) \cdot 10^9$ Бк. Удельная активность ^{177}Lu на момент окончания облучения $\approx 0,33$ мКи/мг. Измерения активности проводили на γ -спектрометре Canberra GL0515R. Для разделения Lu и Yb использована методика, основанная на явлении контактного восстановления (цементации) – электрохимического вытеснения одних металлов другими из их соединений. Детально процесс радиохимического выделения описан в работе [13].

Для синтеза препарата использовался водный раствор конъюгата DOTA-EDA-MTX (4 мг/мл) с молекулярной массой 883 г/моль. Получение $^{177}\text{Lu}[\text{Lu-DOTA-EDA-MTX}]$ проводили в среде 0,15 М CH_3COONa при pH 5,8-6,1. К этой среде, содержащей ^{177}Lu , добавляли препарат так, чтобы концентрация в реакционной смеси составляла значения от 0,01 до 1 ммоль/л. Ввиду хелатирования катиона лигандом DOTA в составе данного конъюгата реакции комплексообразования проводили при 90°C.

Для определения чистоты синтезированного комплекса использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ): элюент – 10% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -MeOH v/v=1/1, неподвижная фаза – SiO_2 на Al. При этих условиях лютеций вне комплекса остается на старте пластины, а комплекс $^{177}\text{Lu}[\text{Lu-DOTA-EDA-MTX}]$ движется с фронтом элюента, поскольку обозначенный элюент используется для анализа комплексов лютеция с олигопептидами [14]. Сканирование пластины после прохождения элюента на предмет гамма-активности позволяет вычислить значение радиохимической чистоты (РХЧ) препарата, представляющее собой отношение активности радионуклида в нужной химической форме (в данном случае в составе терапевтического комплекса) к общей активности радионуклида в образце.

В исследованиях *in vivo* в качестве тест-системы были задействованы аутбредные крысы, самцы в количестве 12 особей. Перед началом исследования животные были распределены на группы: контрольная группа ($n=3$) и $^{177}\text{Lu}[\text{Lu-DOTA-EDA-MTX}]$ ($n=9$).

Адаптация к групповому содержанию в клетках составляла не менее 5 дней. В указанный период у животных ежедневно оценивали общее клиническое состояние путем визуального группового осмотра. Отклонений в клиническом состоянии животных за весь период адаптации не выявлено.

При передаче животных в эксперимент был проведен клинический осмотр партии животных. В экспери-

мент были переданы клинически здоровые животные. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках на подстиле. В каждой клетке находились животные одного вида, получающие один и тот же тестируемый объект. Площадь пола на одно животное соответствовала нормам. В качестве подстилки использовали автоклавированные кукурузные гранулы. Автоклавированный корм для содержания лабораторных животных, приготовленный по ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных».

В экспериментальных исследованиях хронический артрит моделируется введением различных агентов, в том числе введением полного адьюванта Фрейнда. Данная модель широко используется для изучения специфической противовоспалительной активности фармакологических веществ.

Адьювантиндуцированный артрит – это Т-лимфоцитарнозависимый артрит, который включает развитие отека околосуставных тканей, деградацию хряща, потерю функциональной активности сустава, лимфоцитарную инфильтрацию внутрисуставной полости, однако в меньшей степени наблюдается поражение хряща. Первые клинические признаки после введения индуктора патологии наблюдаются уже через 30 мин, а клинические признаки артрита появляются приблизительно через 10 сут после введения адьюванта.

Индуктор патологии, полный адьювант Фрейнда (complete Freund adjuvant (CFA)) производства Sigma Aldrich в объеме 100 мкл вводился крысам в плантарную поверхность правой задней лапы двукратно на 0 и 7-е сут.

Развитие моделируемого патологического процесса протекало без особенностей. Максимальные клинические признаки артрита наблюдались к началу введения тестируемых радиофармацевтических лекарственных препаратов и заключались в выраженном отеке пораженной конечности, покраснении кожных покровов в области поражения с цианотичным оттенком, практически полном отсутствии способности подопытного животного опираться на конечность.

Ежедневно до момента формирования групп лечения проводился индивидуальный клинический осмотр животных, с целью оценки следующих показателей: выраженность отека, степень покраснения лапы и оценка двигательной активности.

Формирование экспериментальных групп осуществлялось при помощи метода модифицированной блоч-

ной рандомизации. Так как реакция организма на моделирующий агент наблюдалась в 100% случаях, в рандомизации участвовали все животные. Для этого всех животных случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел, получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные.

По окончании эксперимента крысы подвергались эвтаназии. Все эвтаназированные животные были подвергнуты процедуре некропсии, включающей внешний осмотр, осмотр места введения исследуемых объектов, всех отверстий, полостей тела и их содержимого, получение биологического материала для прямой радиометрии.

Исследование биораспределения конъюгата [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX производилось общепринятым способом прямой радиометрии с использованием сертифицированного и поверенного оборудования (жидкостной сцинтилляционный счетчик Tri-Carb 2100TR). Исследуемый препарат разводили в изотоническом растворе, после чего следовало добавление немеченого метотрексата для повышения концентрации. Итого, объем одной инъекции составлял 300 мкл, в котором содержалось 5 МБк [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX (концентрация метотрексата 1,78 ммоль/л), введение в крысу осуществлялось через хвостовую вену. Оценка производилась путем прямого сравнения распре-

деления радиофармацевтического препарата в крови и органах животных. С учетом периода полураспада радионуклида ^{177}Lu исследования в контрольных точках при изучении фармакокинетики и биораспределения тестируемых препаратов оценивалось не менее 3 особей животных.

Взятие биологического материала производилось в условиях общего наркоза (инъекционный золотиловый наркоз, внутримышечно) при полной аутопсии животного. После окончания процедуры взятия крови животное подвергалось эвтаназии. Органы и ткани были взвешены и размещены в стерильных пробирках и подвергнуты радиологическому анализу.

Статистическая обработка производилась при помощи пакета программ SPSS for Windows. Проверка характера распределения данных производилась расчетом критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок производилось при помощи U-критерия Манна–Уитни (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$), что является стандартом в медико-биологических исследованиях.

Результаты и обсуждение

Результаты синтеза [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX представлены на **рис. 2**. Видно, что после 20 мин синтеза значительного изменения в радиохимической чистоте не наблюдается. Кроме того, при 0,1 мМ содержания лиганда более 95% радионуклида связано

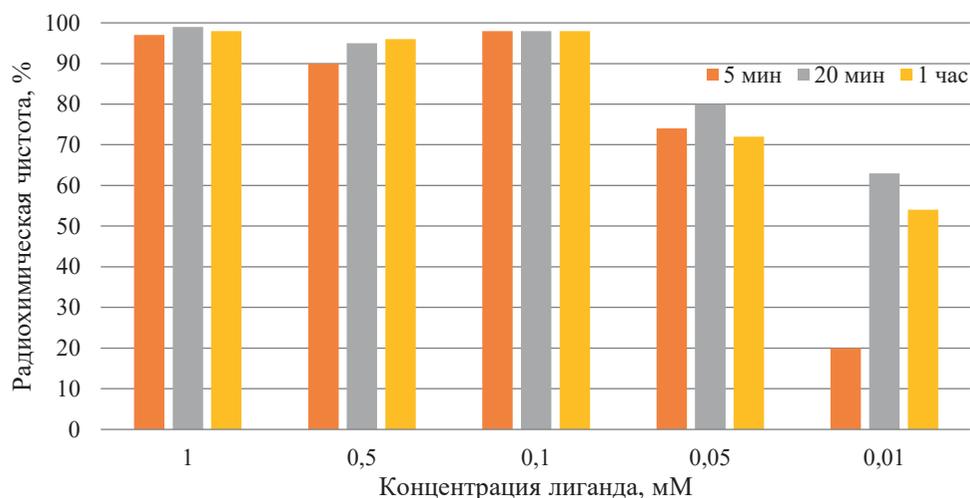


Рис 2. Радиохимическая чистота получаемого меченого комплекса [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в зависимости от концентрации лиганда и времени синтеза.

Fig. 2. Radiochemical purity of the [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX complex depending on the ligand concentration. and synthesis time.

уже через 5 мин. Кинетическую устойчивость конъюгата определяли по РХЧ препарата после выдержки при температуре 37°C в растворе 0,9% NaCl или эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) (HyClone Laboratories) в течение 2 сут. Для изучения диссоциации в среде сывороточных белков образец разбавляли сывороткой в 10 раз: $v([^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}3\text{A-EDA-MTX})/v(\text{ЭТС})=1/9$. Через определённые интервалы времени отбирали 90 мкл образца, денатурировали спиртом $v=270$ мкл, охлаждали при 4°C для более эффективного осаждения белков и центрифугировали

ли при 5000 об/мин в течение 5 мин. Затем отделяли маточный раствор, измеряли на гамма-спектрометре его активность и рассчитывали долю активности, не связанную с белками сыворотки. Устойчивость в изотоническом растворе определяли методом тонкослойной хроматографии. Результаты представлены в **таблице**.

Видно, что в течение 2-х сут инкубирования доля радионуклида, связанного в комплекс, практически не меняется, что говорит об устойчивости данного соединения в этих средах.

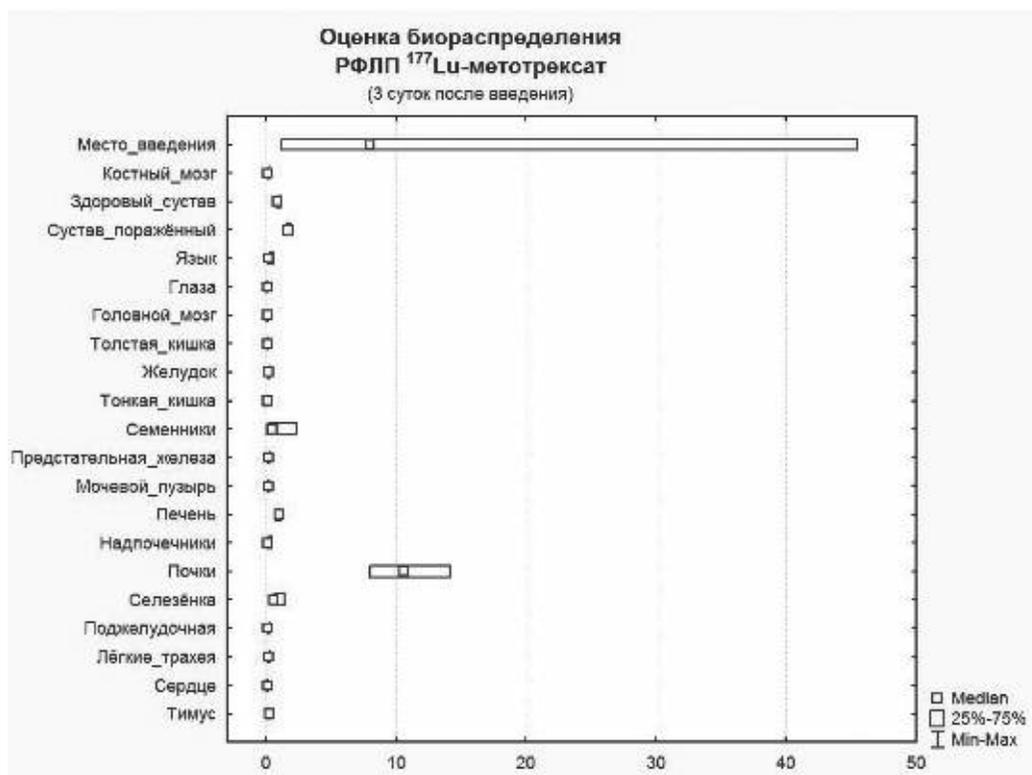


Рис. 3. Оценка биораспределения $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}3\text{A-EDA-MTX}$ в органах крысы с аутоиммунным артритом (контрольная точка 3 сут). По оси X – доля активности в органе от общей введенной активности, деленная на массу органа (%ID / г). Данные приведены в виде Me (QQ) (медиана и квантили) и 95% доверительного интервала.

Fig. 3. Assessment of the biodistribution of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}3\text{A-EDA-MTX}$ in the organs of rats with autoimmune arthritis (control point 3 days). The X axis is the proportion of activity in the organ from the total administered activity, divided by the mass of the organ (%ID / g). Data are presented as Me (QQ) (median and quartiles) and 95% confidence interval.

**Устойчивость $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}3\text{A-EDA-MTX}$ в средах
Stability of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}3\text{A-EDA-MTX}$ in media**

Среда Medium	15 мин 15 min	30 мин 30 min	1 ч 1 hour	3 ч 3 hours	1 сут 1 day	2 сут 2 days
0,9% NaCl	-	-	95±3%	-	98±1%	95±4%
ЭТС FBS	92±6%	85±6%	94±5%	92±3%	93±6%	93±5%

Активность препарата, вводимая животному, составляла 5 МБк. Было проведено обследование крыс в 3 контрольных точках (3-7-15 сут). Сравнительные результаты прямой радиометрии, указывающей на кинетические характеристики и распределение исследуемого препарата [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в организме животного с трансплантированной опухолью приведены на рисунках 3-5. При анализе результатов прямой радиометрии отмечены тенденции к накоплению препарата в нецелевых для терапии органах: ткани почек, сердца, легких. В остальных оцениваемых органах и тканях накопление препарата имело умеренный и, большей частью, транзитный характер или практически не происходило.

При этом отмечается накопление препарата в целевом очаге (пораженный сустав), а именно, доля активности в целевом органе с течением времени увеличивается, уступая лишь обозначенным нецелевым органам с тенденцией накопления препарата.

Через 48 ч после терапии экспериментального аутоиммунного артрита тестируемым препаратом наблюдалось значительное клиническое улучшение (уменьшение отека пораженной конечности, практически полное восстановление окраски покровных тканей) по сравнению с контрольной группой. Через 72 ч после начала лечения все животные из группы введения [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX частично восстановили возможность опираться на пораженную конечность при ходьбе в отличие от контрольной группы.

Заключение

Синтезировано соединение [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX, оптимизированы условия комплексообразования в зависимости концентрации лиганда и продолжительности синтеза.

Проведены исследования устойчивости конъюгата [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в биологических средах – эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС)

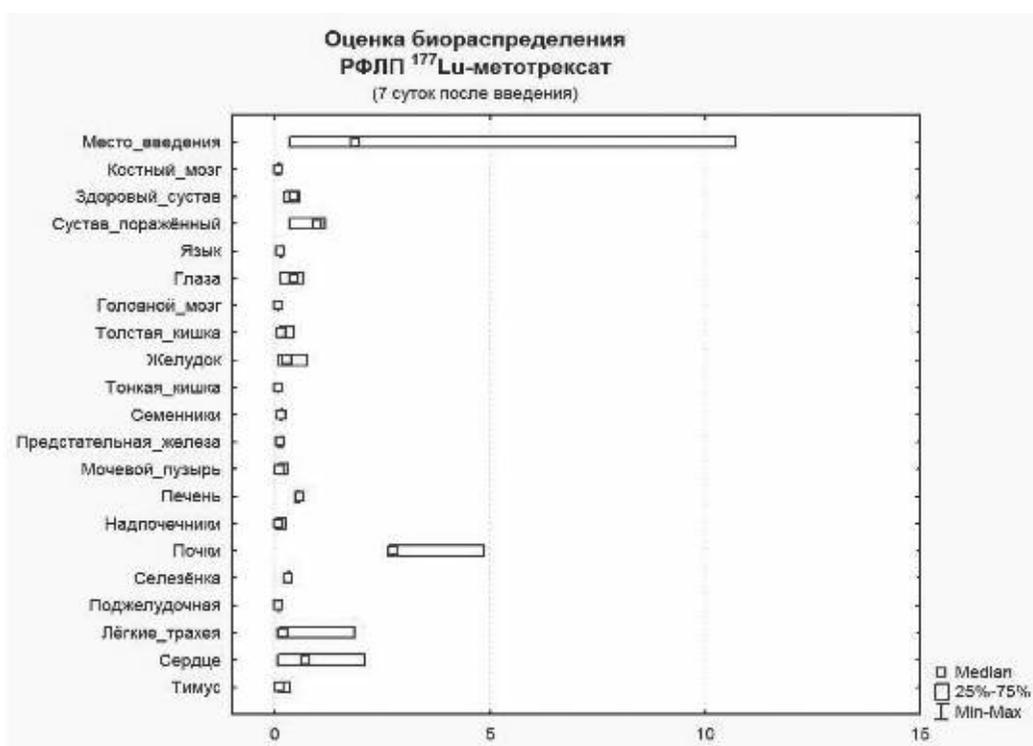


Рис. 4. Оценка биораспределения [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в органах крысы с аутоиммунным артритом (контрольная точка 7 сут). По оси X – доля активности в органе от общей введенной активности, деленная на массу органа (%ID / г). Данные приведены в виде Me (QQ) (медиана и квантили) и 95% доверительного интервала.

Fig. 4. Assessment of the biodistribution of [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX in the organs of rats with autoimmune arthritis (control point 7 days). The X axis is the proportion of activity in the organ from the total administered activity, divided by the mass of the organ (%ID / g). Data are presented as Me (QQ) (median and quartiles) and 95% confidence interval.

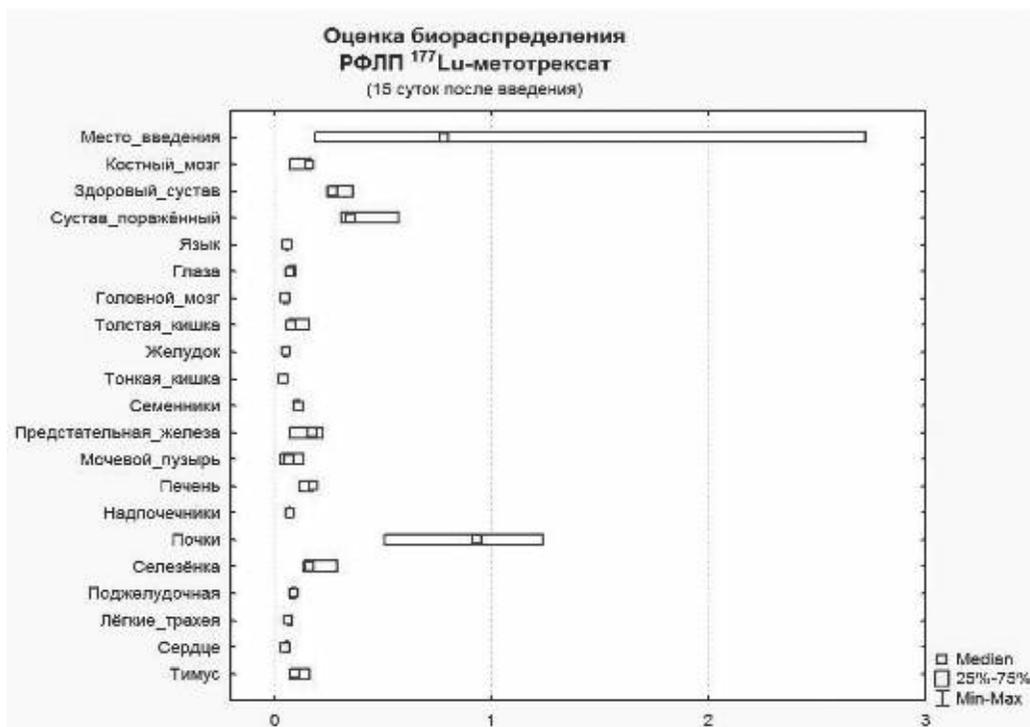


Рис. 5. Оценка биораспределения [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в органах крысы с аутоиммунным артритом (контрольная точка 15 сут). По оси X – доля активности в органе от общей введенной активности, деленная на массу органа (%ID / г). Данные приведены в виде Me (QQ) (медиана и квантили) и 95% доверительного интервала.

Fig. 5. Assessment of the biodistribution of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX in the organs of rats with autoimmune arthritis (control point 15 days). The X axis is the proportion of activity in the organ from the total administered activity, divided by the mass of the organ (%ID / g). Data are presented as Me (QQ) (median and quartiles) and 95% confidence interval.

и изотоническом растворе (0,9% NaCl). Устойчивость в растворе NaCl составила >95%, а в сыворотке ЭТС >85%.

Проведены исследования *in vivo* на лабораторных животных после внедрения ревматоидного артрита. Через 48 часов после начала терапии наблюдалось значительное клиническое улучшение, через 72 ч все животные этой группы частично восстановили возможность опираться на пораженную конечность при ходьбе. Препарат [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX продемонстрировал удовлетворительный уровень эффективности в отношении целевой нозологии: отмечалось клинически значимое улучшение и частичное восстановление функций пораженной конечности.

Результаты исследования могут быть внедрены в практику научной работы по разработке лекарственных средств и средств медицинского применения и являются основанием для проведения расширенного углубленного исследования и оптимизации механиз-

мов таргетного действия исследуемых в данной работе радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Литература (пп. 3-4; 6-14 см. References)

1. Зверев А.В., Крылов В.В., Ханов А.Г., Кочетова Т.Ю. Радиосиноэктомия – метод лечения воспалительных заболеваний суставов с помощью изотопов. *Медицинское обозрение*. 2017; (1): 36–41.
2. Насонов Е.Л. *Противовоспалительная терапия ревматических болезней*. М.: М-Сити; 1996.
5. Насонов Е.Л., Амирджанова В.Н., Олюнин Ю.А. и др. Применение метотрексата при ревматоидном артрите. Рекомендации Общероссийской общественной организации «Ассоциация ревматологов России». *Научно-практическая ревматология*. 2023; 61(4): 435–49.

References

1. Zverev A.V., Krylov V.V., Khanov A.G., et al. Radiosynovectomy is a method of treating inflammatory joint diseases using isotopes. *Meditsinskoe obozrenie*. 2017; (1): 36–41. (in Russian)

2. Nasonov E.L. *Anti-Inflammatory Therapy of Rheumatic Diseases [Protivovospalitel'naya terapiya revmaticheskikh bolezney]*. Moscow; M-City; 1996. (in Russian)
3. Alarcon G.S. *Methotrexate: Its use for the treatment of rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders*. In: Ed. W.J. Koopman. Arthritis and Allied Conditions. A Text Book of Rheumatology, 13th Edition. London; Williams & Wilkins Baltimore; 1997.
4. Papachristou M., Kastis G.A., Stavrou P.Z., Xanthopoulos S., Furenlid L.R., Datsis I.E., et al. Radiolabeled methotrexate as a diagnostic agent of inflammatory target sites: A proof-of-concept study. *Mol Med Rep*. 2018; 17: 2442–8.
5. Nasonov E.L., Amirdzhanova V.N., Olyunin Yu.A. et al. The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. Recommendations of the All-Russian public organization "Association of Rheumatologists of Russia". *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2023; 61(4): 435–49.
6. Rasheed R., Gilani J., Jielani A., Irum F., Lodhi N., Rasheed S., et al. Tc99m Methotrexate (MTX): A Novel Complex for Imaging of Rheumatoid Arthritis (RA): First Clinical Trials. 2015. <https://www.iomcworld.com/open-access/tc99m-methotrexate-mtx-a-novel-complex-for-imaging-of-rheumatoidarthritis-ra-first-clinical-trials-2157-7145-1000S2003.pdf> (Accessed 13.10.2023).
7. Boss S.D., Ametamey S.M. Development of Folate Receptor–Targeted PET Radiopharmaceuticals for Tumor Imaging – A Bench-to-Bedside. *Journey. Cancers*. 2020; 12: 1508–29.
8. Verweij N.J.F., Yaqub M., Bruijnen S.T.G. et al. First in man study of [¹⁸F] fluoro-PEG-folate PET: a novel macrophage imaging technique to visualize rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2020; 10: 1047.
9. El-Safoury D.M., Ahmed Badr Ibrahim, El-Setouhy D.A., Khowessah O.M., Motaleb M.A., Tamer M. Sakr. Amelioration of Tumor Targeting and In Vivo Biodistribution of ^{99m}Tc-Methotrexate-Gold Nanoparticles (^{99m}Tc-Mex-AuNPs). *J Pharm Sci*. 2021; 110: 2955–65.
10. Stetter H., Wolfram F. Complex Formation with Tetraazacycloalkane-N,N',N'',N''';-tetraacetic Acids as a Function of Ring Size. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1976; 15(11): 686.
11. Moi Min K., Claude F. Meares, Sally J. DeNardo. The peptide way to macrocyclic bifunctional chelating agents: synthesis of 2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid and study of its yttrium(III) complex. *Journal of the American Chemical Society*. 1988; 110 (18): 6266–7.
12. Volkert Wynn A., Timothy J. Hoffman. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*. 1999; 99 (9): 2269–92.
13. Makoveeva K.A., Artyukhov A.A., Egorova B.V., et al. On an Efficient Method for Obtaining the Medical Radionuclide ¹⁷⁷Lu and Therapeutic Compounds Based on It. *Nanobiotechnology Reports*. 2023; 18(4): 610–6.
14. Kraihammer M., Garnuszek P., Bauman A., et al. Improved quality control of [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T. *EJNMMI Radiopharm. Chem*. 2023; 8(7).

Сведения об авторах:

Маковеева Ксения Александровна, науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Егорова Байирта Владимировна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НИЦ «Курчатовский институт»; ФГБОУ «МГУ им. М.В. Ломоносова»,

Коков Константин Владимирович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Артюхов Алексей Александрович, канд. хим. наук, нач. лаб., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Кузнецова Татьяна Михайловна, науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Курочкин Александр Вячеславович, науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Еришов А.О., ветеринарный врач, ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Касацкий Павел Сергеевич, мл. науч. сотр., ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Конева Андрей Леонидович, канд. ф.-м. н., рук. отделения, ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Рыбакова А.В., науч. сотр., ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Трашков Александр Петрович, к. м. н., ам. руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий по научной работе ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»; ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Колотаев Антон Владимирович, к. х. н., ст. науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Осипов Василий Николаевич, к. х. н., ст. науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Хачатрян Дереник Саркисович, к. х. н., нач. лаб. ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Чувилин Дмитрий Юрьевич, д. ф.-м. н., зав. отд.-нием, ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Гончаров Николай Гаврилович, д. м. н., помощник президента по медико-биологическим исследованиям ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт».

Приложение 1

Методика определения чистоты конъюгата

Определение содержания основного вещества в исследуемом образце проводится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряжённой с масс-спектрометрией (методом LC/MS).

Содержание основного вещества и идентификацию по молекулярному иону $[M+H]^+$ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим. Испытания проводили в соответствии с методикой,

Приготовление элюента А (вода с 0,01% ТФУК)

В стакан объёмом 3 л наливают 2 л деионизированной воды и добавляют 200 мкл трифторуксусной кислоты (ТФУК), после чего перемешивают на магнитной мешалке при скорости 400 об/мин в течение 3 мин. После этого элюент отфильтровывают через фильтр с порами 0,45 мкм и переливают в чистую стеклянную ёмкость для элюента А.

Приготовление элюента В (ацетонитрил с 0,01% ТФУК)

В стакан объёмом 3 л наливают 2 л ацетонитрила для хроматографии и добавляют 200 мкл ТФУК, после чего перемешивают на магнитной мешалке при скорости 400 об/мин в течение 3 мин. После этого переливают элюент в чистую стеклянную ёмкость для элюента В.

Приготовление раствора для растворения образцов (вода – ацетонитрил – ТФУК 500:500:1).

В стакан объёмом 200 мл наливают 50 мл деионизированной воды и 50 мл ацетонитрила для хроматографии, добавляют 100 мкл ТФУК, после чего перемешивают на магнитной мешалке при скорости 400 оборотов в минуту в течение 3 мин. После этого переливают раствор в чистую стеклянную ёмкость.

Приготовление раствора образца для анализа

На аналитических весах (с точностью 0,1 мг) непосредственно в таре для растворения взвешивают навеску 1 мг образца. Добавляют 2 мл раствора для растворения образцов и выдерживают в ультразвуковой бане в течение 60–120 с до полного растворения. Если в растворе остаются твёрдые включения или муть, то жидкость подвергают центрифугированию в течение 2 мин при 13 000 об/мин на настольной центрифуге. После этого 400 мкл полученного раствора переносят в виал. Виал помещают в автосемплер хроматографической системы Agilent LC/MS 1200.

Проведение LC/MS анализа

Подготовка прибора и проведение анализа производится по инструкции, прилагаемой к прибору.

Колонку перед анализом уравнивают подвижной фазой имеющую состав: 95% элюента А и 5% элюента В, скорость потока 1 мл/мин, до получения стабильной базовой линии (примерно 10 мин). После этого производят анализ образца.

Параметры анализа:

- колонка – ReproSil-Pur Basic C18 5 мкм размером 250×4,6 мм с предколонкой SecurityGuard Cartridges Widedpore C18 4×2 мм;
- объём вводимого раствора образца – 2 мкл;
- скорость потока 1 мл/мин;
- используется градиентная подача элюента по схеме от смеси элюентов 95% А + 5% В до 100% В за 20 мин, затем изократическая подача 100% В в течение 2 мин;
- детектирование на УФ-детекторе с длиной волны 220 нм.

Содержание основного вещества в образце определяется относительной величиной площади пика на хроматограмме.

Спектры ESI-MS регистрируются на MS детекторе Agilent Ion Trap 6310. Ионизация пробы с помощью электроспрея, регистрация в режиме положительных ионов, в некоторых случаях в режиме отрицательных ионов.

Настройки масс-детектора:

- давление на нибулайзере 40 psi;
- напряжение на нибулайзере 3500 вольт;
- поток шторного газа 7 л в мин;
- температура газа носителя 360°C;
- детекция масс в диапазоне от 70 до 1500 атомных единиц массы.

Параметром, характеризующим анализируемое вещество, является молекулярный вес иона, определённый МС детектором.

Испытуемый образец растворяли и анализировали в соответствии с описанной методикой с использованием хроматографической системы Agilent 1290 Infinity LC, оснащённой спектрофотометрическим детектором.

Для идентификации по молекулярному иону испытуемый образец анализировали с использованием хроматографической системы Agilent LC/MS 1290, оснащённой масс-спектрометрическим детектором Agilent Ion Trap 6310.

Методика очистки

Раствор конъюгата в 1 мл ацетонитрила вводят в один приём через шприц Луер-лок в систему препаративного хроматографа Pure C-815 Flash, снабженного колонкой FP ECOFLEX C18 80g (скорость потока 55 мл/мин). Используют градиент ацетонитрил – вода (%): от 5 – 95 до 20 – 80 (18 мин), от 20 – 80 до 40 – 60 (15 мин), от 40 – 60 до 50 – 50 (20 мин), от 50-50 до 95 – 5 (10 мин), 95 – 5 (5 мин). Фракции собирают в пробирки в коллекторе фракций. Фракции, содержащие целевой продукт объединяют. Объединённые фракции с целевым продуктом упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при 40 °С.

Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы

Фурье-спектрометр ЯМР Bruker Avance III Nanobay 300 МГц с рабочей частотой магнитного поля 300.13 МГц на ядрах ^1H и программным обеспечением для сбора, обработки и анализа данных ЯМР.

Весы лабораторные высокого класса точности по ГОСТ Р 53228-2008.

Ампулы стеклянные для ЯМР-спектроскопии с крышками.

Дозатор пипеточный (пипетка одноканальная) переменного объема вместимостью (200-1000) мм³ с допустимой относительной погрешностью не более 2 %.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556-81.

Хлороформ дейтерированный для ЯМР с изотопным содержанием атомов дейтерия 99,9 %, CAS 865-49-6.

Диметилсульфоксид дейтерированный для ЯМР с изотопным содержанием атомов дейтерия 99,9 %, CAS 2206-27-1.

Дейтерийоксид для ЯМР с изотопным содержанием атомов дейтерия 99,9 %, CAS 7789-20-0.

Проведение анализа ЯМР

Около 0,01 г анализируемого образца взвешивают в ампуле, приливают 300 мм³ дейтерированного растворителя. Ампулы с готовыми растворами тщательно встряхивают и протирают ватой для удаления возможных загрязнений. Спектры растворов анализируемых соединений записывают в режиме термостабилизации при 25°С в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

^1H ЯМР (DMSO-*d*₆) δ 8.58 (с, 1H), 7.74 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H, *HetAr*), 6.68 (д, *J* = 8.5 Гц, 2H, *HetAr*), 4.80 (с, 2H), 4.28 (уш. с, 1H), 3.91 – 2.08 (м, 24H, *NCH*₂), 1.53 – 1.38 (м, 27H, *t-Bu*), 1.27 – 0.96 (м, 4H, *CH*₂).

Обзоры

© Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., 2024
УДК 616-092

Тишевская Н.В.¹, Геворкян Н.М.²

Рибонуклеиновые кислоты лимфоидных клеток как регуляторы иммунного ответа и потенциальные индукторы действия противовирусных вакцин

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;
²ФГБНУ «НИИ биомедицины им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10

Клональная организация лимфоидной ткани дает иммунной системе исключительную возможность параллельного развития нескольких независимых процессов, способных оказывать взаимное индуктивное, модулирующее и корректирующее влияние. Межклеточный информационный обмен «лимфоцит-лимфоцит» и «лимфоцит-клетка иного гистотипа» связан не только с цитокиновыми каскадами, но и с функциями не кодирующих белок длинных и коротких молекул РНК, изучение свойств которых имеет большое значение для клинической и профилактической медицины. Целью обзора является обсуждение взаимоотношений между морфогенетической и иммунной функциями лимфоцитов, роли лимфоцитарных РНК в регуляции иммунных процессов и возможности использования лимфоцитарной РНК в качестве адъюванта противовирусных вакцин. Способность организма реагировать не только на чужеродные иммуногенные вещества, но и на собственные антигены обеспечивается многочисленными циркулирующими клонами Т-лимфоцитов, участвующих в формировании иммунитета, и тканеспецифическими Т-лимфоцитами, обладающими морфогенетической функцией. Морфогенетическая и иммунная функции лимфоцитов – важные составляющие единой системы регуляции гомеостаза. К настоящему времени доказано, что эффекты, вызываемые адоптивным переносом лимфоидных клеток, воспроизводятся суммарной РНК этих клеток. Данные о плейотропной и регуляторной роли некодирующих РНК уже позволили внедрить в терапевтическую практику и вакцинопрофилактику нативные и синтетические молекулы РНК, созданные на основе биоинженерных конструкций. В качестве индуктора механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, например, при формировании противовирусной защиты, перспективным представляется использование ксеногенной суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов молодого организма с активными морфогенетическими процессами. Сведения о молекулах РНК, непосредственно взаимодействующих с компонентами иммунной системы и позволяющих при их введении достичь специфического профилактического эффекта, постоянно пополняются по мере совершенствования аналитических методов и получения новых знаний о роли РНК в регуляции иммунных процессов.

Ключевые слова: иммунитет; морфогенетическая функция лимфоцитов; адъюванты вакцин; РНК

Для цитирования: Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Рибонуклеиновые кислоты лимфоидных клеток как регуляторы иммунного ответа и потенциальные индукторы действия противовирусных вакцин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 126-137.
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.126-137

Участие авторов: подбор, анализ и обсуждение материалов, написание и редактирование статьи – Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 гг.) (№ 122022800499-5). (ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.10.2023

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Tishevskaya N.V.¹, Gevorkyan N.M.²

Ribonucleic acids of lymphoid cells as regulators of the immune response and potential inducers of the action of antiviral vaccines

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

²V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya St., Moscow, 119121, Russian Federation

The clonal organization of lymphoid tissue gives the immune system an exceptional opportunity for the parallel development of several independent processes that can exert mutually inductive, modulating, and corrective effects. The intercellular information exchange “lymphocyte-to-lymphocyte” and “lymphocyte-to-a different histotype cell” is associated not only with cytokine cascades, but also with the functions of non-protein-coding long and short RNA molecules. Studying their properties is of great importance for clinical and preventive medicine. The purpose of this review is to discuss the relationship between the morphogenetic and immune functions of lymphocytes, the role of lymphocytic RNA in the regulation of immune processes, and possibilities of using lymphocytic RNA as an adjuvant for antiviral vaccines. The body's ability to respond not only to foreign immunogenic substances, but also to its own antigens is provided by numerous circulating clones of T-lymphocytes involved in the formation of immunity, and tissue-specific T-lymphocytes that have a morphogenetic function. The morphogenetic and immune functions of lymphocytes are important components of a unified system of homeostasis regulation. To date, it has been proven that the effects exerted by the adoptive lymphoid cell transfer are reproduced by the total RNA of these cells. Data on the pleiotropic and regulatory role of non-coding RNAs have already made it possible to introduce native and synthetic RNA molecules based on bioengineered constructs into therapeutic practice and prophylactic vaccination. As an inducer of the mechanisms of innate and adaptive immunity, for example, in the formation of antiviral protection, it seems promising to use xenogenic total RNA isolated from lymphocytes of a young organism with active morphogenetic processes. Information about RNA molecules that directly interact with the components of the immune system and allow them to achieve a specific prophylactic effect when administered is constantly updated as analytical methods improve and new knowledge about the role of RNA in the regulation of immune processes is gained.

Keywords: immunity; morphogenetic function of lymphocytes; vaccine adjuvants; RNA

For citation: Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Ribonucleic acids of lymphoid cells as regulators of the immune response and potential inducers of the action of antiviral vaccines. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 126-137. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.126-137

Author's contribution: discussion, analysis, writing and editing – Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Nina M. Gevorkyan*, researcher, Laboratory of Protein Biosynthesis, Institute of Biomedical Chemistry, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Information about the authors:

Tishevskaya N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4912-3111>

Gevorkyan N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0386-4010>

Financing. This work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research Program for the long-term period for 2021-2030, № 122022800499-5. (V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry).

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

Received 28.10.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

В основе вакцинации, одного из самых действенных методов профилактики многих инфекционных заболеваний, лежит концепция стимуляции иммунного ответа на определенный антиген. Создание эффективных и качественных вакцин, способных вызвать стойкий и напряженный иммунитет, в частности, к вирусным заболеваниям, является актуальной задачей медицинской науки. Вакцины запускают врожденный

иммунный ответ, активируя НК-клетки и антигенпрезентирующие клетки, индуцируя тем самым адаптивный механизм развития Т-клеточного иммунного ответа. При этом давно известно, что эффективность вакцины возрастает в несколько раз при использовании адьювантов – веществ органической или неорганической природы, помогающих усилить исходно слабую иммуногенность вакцин [1, 2]. Адьюванты способствуют запуску врожденного иммунного ответа, индуцированного вакцинальными антигенами, после чего ак-

тивированные антигенпрезентирующие клетки перемещаются в лимфатические узлы, где они определяют тип, величину и качество адаптивного Т-клеточного иммунного ответа. В настоящее время научным работкам, связанным с новыми высокоэффективными адъювантами, уделяется особое внимание. Поиск и создание адъювантов — это передовое научное направление, позволяющее получать вакцины для борьбы со сложными патогенами, вакцины для уязвимых групп населения, плохо реагирующих на традиционные вакцины, а также позволяющее снизить количество антигена в каждой дозе [3]. Улучшение качества иммунного ответа будет означать, что для достижения эффективного иммунитета потребуется меньше доз вакцины, что, несомненно, важно для улучшения глобального снабжения населения разных стран вакцинами. Кроме того, использование действенных адъювантов приведет к усилению иммунного ответа в тех популяциях, где реакция на вакцины обычно снижена, например, у младенцев, пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом. Сравнительный анализ эффективности адъювантов различного происхождения показал, что наилучшие результаты дают вакцины, содержащие в качестве адъюванта вещества с выраженными антигенными свойствами (компоненты клеточных стенок бактерий, оболочки вирусов и пр.), однако именно такие «неспецифические антигены» представляют опасность из-за возможной сенсibilизации вакцинируемых людей и риска развития у них аллергических и аутоиммунных реакций. В связи с этим создание адъювантов иного типа, не уступающих в эффективности антигенсодержащим, является чрезвычайно важным разделом современной вакцинологии. Поскольку лимфоциты являются активными участниками борьбы против вирусов, не вызывает сомнения тот факт, что повышение действенности противовирусных вакцин напрямую связано с увеличением реактивности лимфоцитов инфицируемого организма в отношении вирусных агентов.

При этом наличие некоторого «лаг-периода» между временем попадания вирусных частиц в организм и собственно заражением индивида диктует необходимость поиска путей ускорения реактивного ответа лимфоидных клеток. Открытие явлений, закономерных для процессов вторичного развития, включая проявления регуляторной функции, индуцибельности и высокой индукционной способности у морфогенетически активных лимфоидных клеток [4] и выделенной из них суммарной РНК [5], позволяет сделать новый шаг в развитии вакцинологии и вакцинопрофилактики.

1. Современные представления о взаимоотношениях между морфогенетической и иммунной функциями лимфоцитов

Морфогенетическая функция лимфоидных клеток заключается в их способности регулировать процессы пролиферации и дифференцировки соматических клеток своего и иного гистотипа, запоминать происходящие в организме морфологические изменения и при их повторении более быстро и интенсивно на них реагировать. Морфогенетическая функция лимфоцитов, по-видимому, является гораздо более древней в эволюционном плане, чем иммунная, поскольку лимфоидные клетки, присутствующие у типа иглокожих, у класса круглоротых и класса хрящевых рыб, преимущественно контролируют именно рост и развитие тканей. Доказано, что роль клеток-регуляторов морфогенеза играют Т-лимфоциты: Т-хелперы стимулируют процессы пролиферации и дифференцировки клеток, а цитотоксические Т-лимфоциты подавляют рост и развитие тканей [4]. При этом активность регуляторных влияний сопровождается нарушением динамического равновесия между разными типами Т-клеток, направленность и степень выраженности которого зависит от локализации и стадии регенерационного процесса. Способность Т-лимфоцитов животных, имеющих в своем организме признаки активного морфогенетического процесса, к передаче «регенерационной информации», адресно направленной именно в тот орган реципиента, который регенерирует у донора, по сути, является своеобразным проявлением памяти. В данном случае — морфогенетической, обладающей, однако, важным свойством, характерным для иммунологической памяти: она может развиваться по типу вторичного иммунного ответа, то есть ответная реакция возникает быстрее и интенсивнее. Формирование специфической иммунной реакции организма в ответ на внедрение чужеродного антигена требует времени (нескольких суток) для таких преобразований как реаранжировка генов рецепторов лимфоцитов в процессе подбора наиболее подходящих последовательностей, максимально эффективно взаимодействующих с незнакомым антигеном, селекция наиболее специфических клонов и дальнейшая продукция высокоспецифичных антител. В отличие от этого, морфогенетическая реакция лимфоидных клеток, возникающая на недостаток собственных антигенов, подготовлена заранее и периодически реализуется на протяжении всей жизни индивида в процессе физиологической регенерации органов и тканей. Для нее характерно быстрое рекрутирование Т-хелперов направленного действия

из пула циркулирующих предшествующих форм резервных лимфоцитов в количестве, достаточном для запуска специфического гомеостатического морфогенеза. В определенном смысле морфогенетическая реакция организма сродни вторичному иммунному ответу, поскольку система уже подготовлена и отвечает на знакомый ей сигнал собственного антигена, но при этом она начинает развиваться гораздо раньше вторичной иммунной. Реализация иммунного ответа возможна только при усиленной пролиферации одного из клонов Т-лимфоцитов, требующей как минимум 24-х ч. Морфогенетическую функцию, по всей видимости, осуществляют те Т-клетки, которые в норме регулируют целостность данного органа, и их количества достаточно для запуска морфогенетической активности Т-лимфоцитов, поэтому ответную реакцию можно зарегистрировать уже менее чем через 30 мин после воздействия.

Участие Т-лимфоцитов и в механизмах иммунной защиты, и в морфогенезе напрямую связано с их способностью безошибочно находить точную локализацию нужной ткани (тканеспецифичные «address codes») [6, 7]. Тканеспецифичность рециркулирующих лимфоцитов определяется набором хемотаксических цитокинов (хемокинов), продуцируемых клетками конкретной ткани, и уровнем экспрессии хемокиновых рецепторов к этим белкам на Т-клетках. Чувствительность хемокиновых рецепторов Т-лимфоцитов является основой функции самонаведения (хоминга). Адресная миграция короткоживущих эффекторных Т-лимфоцитов и долгоживущих Т-клеток памяти связана с наличием на их мембране различных типов самонаводящихся рецепторов к белкам-хемокинам С, СС и СХС [8]. В зависимости от цитокинового окружения и направления дифференцировки, Т-лимфоциты экспрессируют разные хемокиновые рецепторы. Например, рецепторы CXCR3 и CXCR6 представлены на CD8⁺ Т-лимфоцитах и Т-хелперах, ответственных за клеточный иммунитет, в то время как CCR3, CCR4 и CCR8 связаны с участием Т-клеток в гуморальном иммунном ответе.

Морфогенетическая и иммунная функции лимфоцитов – важные составляющие единой системы регулирования, и полномочия этой системы гораздо шире, чем только обеспечение защиты от чужеродного генетического материала. Т-лимфоциты, являясь главными участниками иммунных реакций, обладают также многими средствами воздействия на морфогенез, необходимыми для сохранения качественной сущности и анатомической целостности органов, тканей и организма в целом. Эти клетки имеют целый набор ре-

гуляторных «инструментов», среди которых их рецепторный аппарат и синтетическая способность играют не последнюю роль.

Знания о важнейшей роли лимфоцитов в функционировании объединенной нейроиммуноэндокринной системы с каждым годом стремительно обогащаются. В 80-е годы прошлого века было доказано, что гормоны и биологически активные вещества, вырабатываемые нервными, эндокринными и иммунными клетками, идентичны по своим физико-химическим и функциональным свойствам [9]. Эти данные стали основой дальнейших исследований особенностей нейроиммуноэндокринных взаимодействий [10–12], в результате которых был сделан вывод, что для эффективного поддержания структурного и функционального гомеостаза клеточные элементы каждой из трех систем должны располагать полной информацией о малейших изменениях, происходящих на двух других вершинах этого своеобразного «регуляторного треугольника».

Среди всех клеток иммунной системы именно Т-лимфоциты являются наиболее мобильными, фенотипически разнообразными и функционально активными. Они способны синтезировать как классические гормоны [13], так и тканевые факторы роста [14]: соматотропин, пролактин, инсулин, катехоламины, эпидермальный фактор роста, амфирегулин, трансформирующий фактор роста β, фактор роста фибробластов, эндотелиальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, индуцируемый гипоксией фактор – 1α. Т-лимфоциты, получая гуморальные сигналы и секретуруя биологически активные вещества дистантного и местного действия, осуществляют адресную регуляцию иммунной или морфогенетической активности, оповещая при этом весь организм о необходимости реализации пролиферативного, дифференцировочного, синтетического или другого процесса. Однако реактивность иммунной системы по-прежнему часто отождествляют только с иммунным ответом, несмотря на убедительные факты, свидетельствующие о том, что непосредственно иммунный ответ – это лишь часть ее многообразных функций. Клональная организация лимфоидной ткани в составе единого комплексного лимфоидного органа дает иммунной системе исключительную возможность параллельного развития нескольких независимых процессов, способных оказывать взаимное индуктивное, модулирующее и корригирующее влияние. При этом развитие каждого такого процесса, включая и формирование противовирусного иммунитета, всегда начинается с реакций врожденных, со сложного каскада последовательных взаимообусловленных индукционных явлений, с последующим

подключением этапов, характерных для адаптивного иммунитета, вплоть до его завершения, т.е. образования клеток памяти.

В основе реакций иммунной системы на индукторы иммунного ответа и индукторы морфогенеза лежит фундаментальное сходство процессов вторичного развития, состоящее в том, что во всех случаях организм отвечает запуском каскада врожденных стереотипных реакций, синтезом цитокинов и других биологически активных веществ, что позволяет отнести эти процессы к категории универсальных функциональных блоков. Адьювантное действие комплекса реакций врожденного иммунитета распространяется как на иммунные процессы, связанные с продукцией антител, так и на морфогенетические процессы регенерации и компенсаторной гипертрофии, а также на реакции, возникающие при экстремальных воздействиях и заканчивающиеся развитием патологических состояний. Вместе с тем, дальнейшие стадии процессов вторичного развития (как иммунных, так и морфогенетических), каждый из которых приобретает в ходе формирования свои специфические особенности, обладают еще более выраженными адьювантными свойствами.

Способность лимфоидных клеток реагировать не только на чужеродные организму иммуногенные вещества, но и на собственные антигены, качественно и/или количественно нарушающие гомеостаз, обеспечивается многочисленными циркулирующими клонами Т-лимфоцитов, участвующих в формировании иммунитета, и тканеспецифическими Т-лимфоцитами, обладающими морфогенетической функцией. Ярким примером этого является участие регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) в миогенезе. Современные данные мировой литературы свидетельствуют о том, что Treg в большом количестве обнаруживаются вокруг регенерирующих мышечных волокон [15, 16]. Предполагается, что это особая популяция Treg, которая пролиферирует не в лимфоузлах и селезенке, а в месте повреждения мышечной ткани. Особенностью этих регуляторных Т-клеток «мышечного типа» является их способность к синтезу фактора роста – амфирегулина. Поскольку среди Т-лимфоцитов селезенки обнаружены амфирегулин-продуцирующие Т-клетки, вполне возможно, что эти уже «обученные» Т-клетки мигрируют из нее в поврежденную мышцу. К настоящему времени доказано, что «обслуживающие» конкретную мышцу Treg посредством амфирегулина напрямую усиливают пролиферацию и дифференцировку клеток-миосателлитов *in vivo* и *in vitro*, а у мышей, лишенных Treg, регенеративный потенциал миосателлитов значительно снижается. Кроме того, в ор-

ганизме лабораторных грызунов были обнаружены Т-клетки памяти, которые начинают экспрессировать специфические миорегуляторные белки при повторных повреждениях мышцы.

2. Участие лимфоцитарных РНК в регуляции иммунных процессов

За последние 20 лет наши представления о рибонуклеиновых кислотах существенно изменились. Оказалось, что их роль не ограничивается процессами синтеза белка, эти молекулы выполняют множество функций, фактически регулируя все этапы онтогенеза. При этом многим из них свойственна тканеспецифичная экспрессия, транскрипция на определенных стадиях развития клеток и способность контролировать подвластные им процессы при их переносе в другой организм.

Впервые о возможности переноса иммунной информации от доноров к реципиентам с помощью рибонуклеиновых кислот, выделенных из лимфоидных клеток, заговорили в 50-60-е гг. прошлого века [17, 18]. В частности, было показано, что рибонуклеопротеины (РНП), выделенные из лимфоцитов селезенки кроликов после иммунизации антигеном, полученным из убитых тепловым воздействием паратифозных бактерий, вызывают развитие специфического паратифозного иммунитета у 5-дневных крольчат-реципиентов. При этом антитела в их крови появлялись через месяц, что свидетельствовало о переносе в организм реципиента именно информации о необходимости антителопродукции, и память об этом событии сохранилась в иммунокомпетентных клетках. В экспериментах *in vitro* было установлено, что добавление к культивируемым лимфоцитам РНК, выделенной из перитонеальных макрофагов, предварительно проинкубированных с бактериофагами, вызывает продукцию антител к этому бактериофагу в культуре лимфоцитов, при этом присутствие в культуральной среде рибонуклеаз полностью отменяло антителопродукцию [19]. Позже было доказано, что посредством экзогенной РНК лимфоидных клеток, освобожденной от примесей белка и ДНК, можно воспроизвести многие формы иммунного ответа у сингенных, аллогенных и ксеногенных реципиентов (реакцию гиперчувствительности замедленного типа, трансплантационный иммунитет, реакцию «трансплантат против хозяина», признаки аутоиммунной патологии и т.д.), то есть индуцировать усиление иммунореактивности и резистентности при самых разных заболеваниях, вплоть до особо опасных инфекций [20]. Формирующийся после введения экзогенной лимфоцитарной РНК феномен иммунологической па-

мяти сохраняется достаточно долго. В экспериментах *in vitro* лимфоидные клетки-реципиенты экзогенной РНК были способны продуцировать специфические антитела на протяжении 15-17 делений.

В физиологических условиях лимфоидные клетки активно участвуют в процессах межклеточного информационного обмена посредством экзосомного транспорта. РНК-содержащие экзосомы образуются всеми типами лимфоцитов, благодаря чему последние способны регулировать функции других клеток как внутри иммунной системы, так и за ее пределами. Так, адоптивный перенос экзосом, продуцируемых В-лимфоцитами донора, индуцирует мощный Т-клеточный иммунный ответ в организме реципиента [21]. Экзосомы активированных Т-лимфоцитов инициируют пролиферацию покоящихся Т-клеток и стимулируют в них секрецию адгезивных молекул, ИЛ-16, гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (КСФ-ГМ) и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов [22]. Существует мнение, что лимфоциты могут образовывать 2 вида экзосом: иммунные, РНК которых участвует в регуляции механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, и неиммунные, посредством которых РНК лимфоидных клеток осуществляют дистантную синхронизацию пролиферации и дифференцировки различных тканей [23].

В межклеточном информационном обмене «лимфоцит-лимфоцит» и «лимфоцит-клетка иного гистотипа» участвуют как длинные, так и короткие молекулы РНК. Длинные некодирующие РНК (lncRNAs), содержащие более 200 нуклеотидов, влияют на дифференцировку и активацию иммунных клеток, изменяя тем самым ход формирования реакций врожденного и адаптивного иммунитета [24]. Например, показано, что длинная РНК-молекула TMEVPG1/NeST активирует экспрессию гена интерферона- γ в эффекторных Т-хелперах 1 типа [25], а молекула lincRNA-Coх2 подавляет экспрессию генов некоторых хемокинов и хемокиновых рецепторов, способствуя тем самым увеличению мобильности лимфоидных клеток [26]. Нормальный хоминг Т-лимфоцитов обеспечивает также длинная некодирующая РНК lincR-Ccr2-5'AS [27]. Ген этой РНК расположен вблизи генов, кодирующих хемокиновые рецепторы CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5. Подавление экспрессии гена lincR-Ccr2-5'AS в клетках Th2 путем введения коротких шпилечных РНК приводило к снижению числа указанных рецепторов на мембране лимфоцитов в 1,5-2,5 раза. При изучении миграционной способности этих модифицированных Т-клеток в условиях *in vivo* было уста-

новлено, что через 20 часов после их адоптивного переноса в легочной ткани здоровых мышей обнаруживается в 5 раз меньше Т-лимфоцитов с подавленной экспрессией lincR-Ccr2-5'AS по сравнению с одновременно введенными в том же количестве нормальными Т-клетками. В то же время подавление активности гена lincR-Ccr2-5'AS в Т-хелперах 17 типа не сопровождалось какими-либо изменениями экспрессии генов хемокиновых рецепторов или цитокинов, что свидетельствует о явной специфичности механизмов действия lincR-Ccr2-5'AS в отношении нормального функционирования разных типов Т-клеток. Длинная некодирующая РНК linc-MAF-4 управляет направленностью дифференцировки Т-лимфоцитов путем модуляции экспрессии гена транскрипционного фактора c-Maf [28]. При дифференцировке наивных CD4+ лимфоцитов в сторону Th1 в течение первых трех дней количество linc-MAF-4 в этих клетках было минимальным, а содержание мРНК c-Maf — велико, но затем экспрессия linc-MAF-4 стала нарастать, что привело к подавлению транскрипции гена c-Maf. В развивающихся Th2 лимфоцитах наблюдалась другая картина: уровень linc-MAF-4 в них оставался минимальным в течение всего срока наблюдения, а количество мРНК c-Maf постоянно увеличивалось и к 8-м суткам превысило исходный уровень в 7 раз.

МикроРНК представляют собой некодирующие одноцепочечные РНК длиной 6–8 нм с 19–25 нуклеотидами, которые регулируют экспрессию генов и синтез белка на уровне трансляции [29]. Регуляторные эффекты лимфоцитарных микроРНК к настоящему времени изучены намного подробнее, чем механизмы действия длинных РНК-молекул [30]. Спектр продуцируемых лимфоцитами микроРНК зависит от фенотипа клеток и степени их зрелости. При этом существует довольно большой пул микроРНК, являющихся «общими» для всех лимфоидных клеток, но в то же время выявлены и специфические для каждой разновидности лимфоцитов микромолекулы. Например, в зрелых Т- и В-лимфоцитах образуются 103 «общие» молекулы микроРНК [31], а у зрелых Т-лимфоцитов и Т-клеток, еще не прошедших все этапы дифференцировки в тимусе, таких «общих» микромолекул гораздо меньше — 40, и все эти 40 микроРНК продуцируются также и В-лимфоцитами (см. рисунок). Вполне вероятно, что 63 микроРНК, характерные только для зрелых Т- и В-лимфоцитов, необходимы для реализации полноценного иммунного ответа, в основе которого лежит взаимодействие лимфоидных клеток при попадании в организм чужеродного антигена, а 14 специфических микроРНК, обнаруживаемых только в зрелых Т-лим-

фоцитах, связаны с обеспечением их морфогенетической функции.

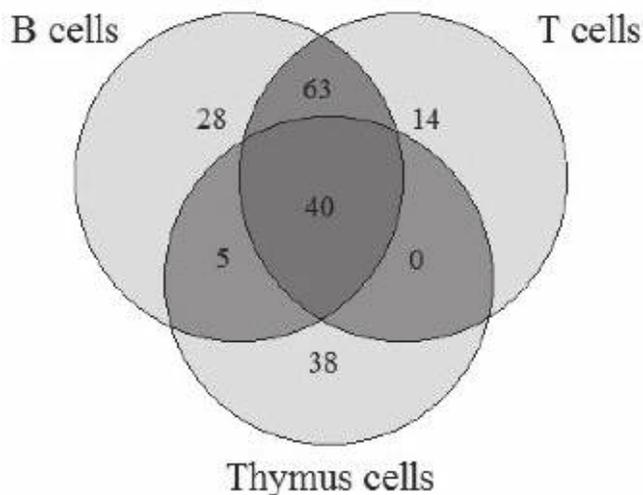
Одной из наиболее широко изученных микроРНК в лимфоцитах является микроРНК-155, которая влияет на функциональную активность множества иммунных клеток, включая В- и Т-лимфоциты, моноциты, дендритные клетки и НК-клетки [32]. Мыши с дефицитом микроРНК-155 имеют нарушенный гуморальный ответ на иммунизацию, их лимфоциты не синтезируют иммуноглобулин М. После иммунизации живой аттенуированной формой *Salmonella typhimurium* мыши с дефицитом микроРНК-155 были более восприимчивы к заболеванию и легко заражались вирулентным штаммом, в то время как у мышей с повышенной экспрессией этой РНК было увеличено количество В-лимфоцитов и регистрировался высокий уровень секреции антигенспецифических антител при Т-клеточно-зависимой иммунизации. Кроме того, было установлено, что микроРНК-155 ингибирует негативные регуляторы цитокиновой сигнализации SOCS1 и SHIP1, повышая тем самым активность функционирующих цитокиновых систем интерферона и ИЛ-4 [33, 34].

Важно отметить, что изучение функций различных лимфоцитарных микроРНК находится только в самом начале пути, и пока еще есть много неясных моментов в расшифровке этих сложных эпигеномных путей регуляции врожденного и адаптивного иммунных от-

ветов. Например, к настоящему времени установлено, что кластер микроРНК-17-92, транскрибируемый как единый фрагмент, состоит из шести различных микромолекул. Эти микроРНК могут оказывать как однонаправленное, так и разнонаправленное действие на пролиферацию, дифференцировку и секреторную активность Т-хелперов [35]. МикроРНК-19b полностью восстанавливает экспрессию интерферона-γ в Т-хелперах 1 типа у мышей с дефицитом кластера микроРНК-17-92 [36]. МикроРНК-21 регулирует дифференцировку клеток Th1 путем модуляции в дендритных клетках синтеза ИЛ-2, который индуцирует экспрессию транскрипционного фактора T-bet, необходимого для образования Т-хелперов 1 типа [37]. На этот же транскрипционный фактор воздействует, как оказалось, и микроРНК-29, восстанавливающая нормальный уровень экспрессии T-bet даже в лимфоцитах, лишенных способности к образованию собственных микроРНК [38]. Дальнейшие исследования микроРНК-29 продемонстрировали исключительную важность этой малой РНК-молекулы для формирования иммунного ответа в целом, поскольку было доказано ее участие в 3-х важнейших процессах: контроле репертуара продуцируемых тимусом Т-клеток, создании соответствующих условий для поляризации Т-лимфоцитов в том или ином направлении дифференцировки после активации и ограничении онкогенной трансформации В-клеток [39].

3. Теоретические предпосылки использования лимфоцитарной РНК в качестве адъюванта противовирусных вакцин

Быстро развивающиеся исследования перспектив использования РНК уже привели к значительным достижениям в области биомедицины. К настоящему времени наука располагает множеством данных о плейотропной и регуляторной роли молекул РНК, что позволило внедрить в терапевтическую практику различные синтетические некодирующие РНК, созданные на основе биоинженерных конструкций. Знания о том, что иммуностимулирующие эндогенные рибонуклеиновые кислоты индуцируют синтез и секрецию цитокинов и интерферонов, подтолкнули ученых к идее использования синтетических молекул РНК для модуляции иммунного ответа в организме человека. Сведения о молекулах РНК, непосредственно взаимодействующих с компонентами иммунной системы и позволяющих при их введении достичь специфического лечебного эффекта, постоянно пополняются по мере совершенствования аналитических методов, методов синтеза нуклеиновых кислот и разработки средств их



Сравнительный анализ профилей микроРНК в экзосомах зрелых Т-лимфоцитов, клеток тимуса и В-лимфоцитов [31]. Числами обозначено количество общих и специфических микроРНК.

Comparative analysis of miRNA profiles in exosomes of mature T lymphocytes, thymus cells, and B lymphocytes [31]. The number of common and specific miRNAs is indicated.

доставки в орган-мишень [40]. Различные формы РНК используют для избирательного воздействия на белки, транскрипты и гены. Целый ряд препаратов РНК уже одобрен для медицинского применения [41, 42]. Например, аптамер Пегаптаниб – короткая одноцепочечная РНК-молекула, высокоспецифично узнающая определенные молекулы-мишени, предназначена для целевого перемещения малых интерферирующих РНК. Использование аптамеров является весьма перспективным направлением разработки противораковых и противовирусных лекарственных средств, поскольку они имеют целый ряд положительных свойств: простоту получения в сравнении с моноклональными антителами, низкую иммуногенность и высокую проникающую способность.

Терапевтическим эффектом обладают не только синтетические, но и нативные молекулы РНК. Так, доказано, что удивительно стабильными являются микроРНК растительного происхождения, поскольку, пройдя через ферментный конвейер желудочно-кишечного тракта и попав затем в кровь, они сохраняют свою способность к регуляции экспрессии генов-мишеней у млекопитающих [43]. Например, микроРНК-2911, выделенная из ягод жимолости, полностью сохраняла свои свойства даже после длительного кипячения отвара, и после перорального введения обнаруживалась в плазме и легочной ткани экспериментальных животных. Отвар ягод жимолости используется в китайской медицине при симптомах респираторных вирусных заболеваний, и обнаружение в нем стабильной и активной микроРНК-2911 позволило приоткрыть завесу тайны эффективности некоторых методов народной медицины. Были получены убедительные доказательства того, что микроРНК-2911 обладает выраженным противовирусным действием – она подавляет репликацию вируса гриппа как *in vivo*, так и в системе *in vitro*, а также значительно снижает смертность среди инфицированных животных [44]. Аналогичные данные были получены при исследовании вирусной нагрузки у пациентов с COVID-19: пероральное введение отвара жимолости, содержащего микроРНК-2911, блокировало репликацию вируса SARS-CoV-2 [45].

В то же время обнаружение терапевтического потенциала молекул РНК открыло широкие возможности для поиска новых способов профилактики как соматической, так и инфекционной патологии. В последние несколько лет в арсенале профилактической медицины появились вакцины, созданные на основе кодирующих антиген матричных РНК, которые вводятся в соматические клетки для последующего синтеза ими

антигенов с целью активации у реципиента иммунного ответа. Однако еще более перспективным является поиск небольших молекул, способных эпигенетически перепрограммировать механизмы врожденного иммунитета. При разработке этих методов предполагается, что такое перепрограммирование будет стимулировать более выраженный врожденный иммунный ответ и обеспечит повышенную устойчивость организма к вирусной нагрузке [46].

Молекулы РНК успешно используются и в качестве адъювантов вакцин. Адъювантной способностью обладают олигонуклеотиды – агонисты образующих рецепторов на иммунных клетках. Известно, что в распознавании экзогенных РНК ключевую роль играют особенности их молекулярного строения: длина, двух- или одноцепочечная конфигурация, модификация нуклеозидов и их последовательности. У млекопитающих существует несколько типов образующих рецепторов, которые обнаруживают нуклеиновые кислоты и активируют врожденный иммунный ответ. Они находятся на плазматической мембране, в эндосомах или в цитоплазме дендритных клеток, макрофагов, естественных киллеров и В-лимфоцитов. В качестве адъювантов вакцин используются агонисты TRL9, участвующего в формировании иммунного ответа на бактериальную инфекцию, а также агонисты TLR3 и кольцевые РНК, являющиеся агонистами RIG-I-подобных рецепторов, активация которых обеспечивает запуск противовирусной защиты [47]. Доказано, что инактивированные вакцины, вводимые вместе с этими адъювантами, индуцируют такой же устойчивый и стойкий гуморальный ответ, как и живые вакцины.

Интересные данные были получены при использовании синтетической одноцепочечной РНК в качестве адъюванта инактивированной противогриппозной вакцины и вакцины, содержащей шиповидный белок MERS-CoV (коронавируса ближневосточного респираторного синдрома) [48]. Мышей иммунизировали два раза в неделю с двухнедельными интервалами, вакцину с адъювантом вводили интраназально, внутримышечно или внутрикожно; количество РНК при каждом введении составляло 20 мкг. Во всех опытных группах животных, получивших вакцину с РНК-адъювантом, было отмечено достоверное увеличение активности дендритных клеток и макрофагов. При этом в группах животных «MERS-CoV + РНК-адъювант» самый выраженный гуморальный иммунный ответ, характеризующийся образованием иммуноглобулинов G и нейтрализующих антител, отмечался у мышей, получивших препараты внутримышечно. Интра-

назальное же введение характеризовалось активацией Т-хелперов 1 типа с усилением ими продукции интерферона- γ и ИЛ-2, а также усилением продукции иммуноглобулина А. Иммунизация животных инактивированными вирусами гриппа совместно с РНК-адьювантом вызывала существенное снижение титра вируса в легких и сопровождалась 100%-ной выживаемостью, тогда как выживаемость в контрольной группе мышей, не получавших РНК-адьювант, составила 90%. Кроме того, независимо от пути введения, РНК-адьювант способствовал увеличению уровня иммуноглобулинов G и A у подопытных животных. Особенно важно, что аналогичные данные были получены не только у молодых, но и у стареющих животных [49]. РНК-адьювант, добавленный к противогриппозной вакцине, в организме старых мышей существенно снижал титр вируса в легочной ткани и бронхоальвеолярной жидкости, индуцировал сбалансированные ответы Th1/Th2, увеличивал в селезенке число Т-хелперов, продуцирующих интерферон- γ , ИЛ-2 и фактор некроза опухоли- α . Полученные авторами результаты имеют очень большое значение, поскольку известно, что противогриппозные вакцины малоэффективны в пожилом возрасте из-за изменений в популяциях Т-клеток и снижения их функционального резерва [50].

Нативные РНК также могут быть использованы в качестве адьювантов различных вакцин, в частности, пероральных вакцин, полученных на основе генетически модифицированных растений [51]. Эта идея основывается на доказательствах биодоступности попадающих в организм человека с пищей растительных микроРНК, которые не подвергаются действию РНКаз и сохраняют способность модулировать экспрессию генов [52]. Поскольку создание пероральных вакцин против вирусов гепатита В, кори, кишечных норовирусов и др. на основе модифицированных съедобных растений (картофеля, томатов, риса, кукурузы и т.д.) предполагает использование неповрежденных клеток, добавление к ним в качестве адьюванта молекул РНК, нацеленных на активацию систем врожденного и адаптивного иммунитета, безусловно, позволит повысить иммуногенность вакцин.

Однако выделение конкретных молекул РНК или создание их синтетических аналогов — чрезвычайно длительный и дорогостоящий процесс, и в живом организме по-прежнему остается открытым вопрос о направленной доставке этих молекул в клетки-мишени. Кроме того, эпигеномная регуляция любого патологического процесса представляет собой очень сложную систему, в которой участвуют десятки, а может быть и сотни, молекул РНК. В связи с этим исполь-

зование в качестве адьюванта суммарной РНК, выделенной из функционально активных клеток, может оказаться гораздо более эффективным, нежели поиск и выделение отдельных длинных или малых некодирующих РНК. При сравнительном анализе эффектов суммарной РНК и выделенной из нее микроРНК было установлено, что они обладают одинаковым по результативности действием [44]. При этом если рассуждать о стимуляции иммунных процессов, то в качестве источника суммарной РНК, несомненно, должны быть выбраны лимфоидные клетки.

Явление усиления иммунного ответа при сочетании одновременно протекающих иммунных реакций на разные антигены хорошо известно. Такое же усиление реактивности клеток иммунной системы наблюдается и при сочетании одновременно протекающих морфогенетических процессов, а также при сочетанном действии двух разных процессов вторичного развития: иммунного и регенерационного. То, что адьювантный эффект во всех этих случаях обусловлен лимфоидными клетками, следует из их способности вызывать тот же эффект в организме интактного сингенного реципиента после их адоптивного переноса. При этом регенерационные процессы обладают более сильным адьювантным свойством по сравнению с иммунными. Например, адоптивный перенос лимфоидных клеток, активированных восстановительным морфогенезом, увеличивает продукцию антител в организме реципиента более чем в 2 раза, а в отдельных случаях — до 5-6 раз, в зависимости от вида поврежденного органа и стадии его регенерации в донорском организме [4]. Результаты исследований последних лет в системах *in vitro* и *in vivo* убедительно доказали, что эффекты, вызываемые адоптивным переносом лимфоидных клеток, воспроизводятся суммарной РНК, выделенной из этих клеток. Было показано, что постоянно происходящего в норме процесса физиологической регенерации органов и тканей вполне достаточно, чтобы вводимая экзогенно фракция суммарной РНК, выделенная из лимфоцитов селезенки интактных экспериментальных животных или лимфоцитов периферической крови молодых здоровых доноров, без дополнительной активации вызывала у реципиента значимое повышение реактивности тканей и органов [53, 54]. Обнаруженная способность суммарной РНК лимфоидных клеток воспроизводить у реципиентов всю совокупность морфогенетических эффектов, реализуемых в организме донора и присущих донорским клеткам в момент изъятия их из организма, придает адьювантным свойствам РНК, выделенной из этих клеток, ряд преимуществ по сравнению с самими клетками. В частности, это касается отсутствия ксеногенных ограничений, что связано с известной кон-

сервативностью эпигеномных механизмов РНК-регуляции. Так, суммарная РНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови человека, стимулирует пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток у крыс [55], а суммарная РНК лимфоцитов свиной селезенки стимулирует миогенез у лабораторных грызунов [56]. Генетическими методами было доказано, что микроРНК, выделенные из пастеризованного коровьего молока, могут регулировать экспрессию многих генов у человека [57]. Использование в качестве адьюванта суммарных лимфоцитарных РНК молодых здоровых животных-доноров может стать перспективным и безопасным способом повышения эффективности вакцин, в особенности у групп населения, характеризующихся слабым иммунным ответом и нестабильностью иммунных процессов в целом (пожилые, дети раннего возраста) [58]. Контакт с экзогенной РНК, лимфоидная система реципиента получит необходимый морфогенетический стимул, а реакции, вызванные таким стимулом, будут ограничены рамками физиологической нормы, включающими в себя адекватную реакцию как врожденных, так и адаптивных звеньев иммунного ответа.

Литература

(п.п. 1; 3; 5-13; 15-17; 19; 21-52; 57 см. References)

2. Исаенко Е.Ю., Бабич Е.М., Елисеева И.В. и др. Адьюванты в современной вакцинологии. *Annals of Mechnikov Institute*. 2013; 4: 5-21.
4. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М: РАМН; 2009.
14. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Т-лимфоциты и тканевые факторы роста. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101(8): 865-84.
18. Цикаришвили Т.Н., Аксенова Н.Н., Фель В.Я. и др. О межклеточной передаче информации в процессе иммунизации. Влияние РНК из селезенки иммунизированных крыс на клетки крысиной лимфосаркомы. *Цитология*. 1969; 11(3): 389-92.
20. Смирнов А.В. Специфические эффекты и возможные механизмы действия экзогенных РНК. *Успехи совр. биологии*. 1988; 106(1): 20-36.
53. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. и др. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоэз *in vitro*. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 35-9.
54. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. и др. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в культуре эритробластических островков крыс с полицитемией. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 40-3.
55. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. и др. О гемопэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 10(2): 58-62.
56. Тишевская Н.В., Головнева Е.С., Галлямутдинов Р.В. и др. Ксеногенная лимфоцитарная РНК стимулирует физиологическую регенерацию скелетных мышц. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 23(3): 134-41. DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-134-141
58. Каральник Б.В. На путях к индивидуализации вакцинации: значение возраста и пола. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(6): 88-99. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-88-99>

References

1. Shi S., Zhu H., Xia X., et al. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 2019; 37(24): 3167-78. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.04.055
2. Isayenko E.Y., Babich E.M., Yeliseyeva I.V., et al. Adjuvants in modern vaccinology. *Annals of Mechnikov Institute*. 2013; 4: 5-21. (In Russian)
3. Di Pasquale A., Preiss S., Tavares Da Silva F., et al. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*. 2015; 3(2): 320-43.
4. Babayeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov Y.A. The role of lymphocytes in the operational change of the tissue development program. [*Rol' limfotsitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney*]. Moscow: RAMN. 2009. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in the intercellular information exchange and in the regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2016; 102(11): 1280-301. (In Russian)
6. Ebert L.M., Schaerli P., Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol*. 2005; 42(7): 799-809. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.040>
7. Mora J.R., Cheng G., Picarella D., et al. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med*. 2005; 201(2): 303-16. <https://doi.org/10.1084/jem.20041645>
8. Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2005; 12(6): 444-50. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000177827.78280.79>
9. Carr D.J., Blalock J.E. From the neuroendocrinology of lymphocytes toward a molecular basis of the network theory. *Horm Res*. 1989; 31(1-2): 76-80.
10. Varela F.J., Coutinho A., Dupire B., et al. Cognitive Networks: Immune, Neural, and Otherwise. *Theoretical Immunology*. 2003; 2: 356-8.
11. Dozmorov I.M., Dresser D. Immune system as a sensory system. *Int. J. Biomed. Sci*. 2010; 6(3): 167-75.
12. Kamimura D., Tanaka Y., Hasebe R., et al. Bidirectional communication between neural and immune systems. *Int. Immunol*. 2020; 32(11): 693-701. DOI: 10.1093/intimm/dxz083
13. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(2): 189-202. (In Russian)
14. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. T-lymphocytes and tissue growth factors. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2015; 101(8): 865-84. (In Russian)
15. Li J., Tan J., Martino M.M., et al. Regulatory T-Cells: Potential regulator of tissue repair and regeneration. *Front. Immunol*. 2018; 9: 585. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00585>

16. Tidball J.G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(3): 165-78. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>
17. Sterzl J., Hrubesova M. The transfer of antibody formation by means of nucleoprotein fractions to non-immunized recipients. *Fol. biol.* 1956; 2: 21.
18. Tsikarishvili T.N., Aksenova N.N., Fel V., et al. On the intercellular transmission of information in the immunization process. The effect of RNA from the spleen of immunized rats on rat lymphosarcoma cells. *Tsitologiya.* 1969; 11(3): 389-92. (In Russian)
19. Fishman M. Antibody formation in vitro. *J. Exp. Med.* 1961; 114: 837-56.
20. Smirnov A.V. Specific effects and possible mechanisms of action of exogenous RNA. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 1988; 106(1): 20-36. (In Russian)
21. Liu W., Lu J., Zhou H., et al. Role of B cell-derived exosomes in immunoregulation: Review. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2021; 37(2): 174-7. (In China)
22. Wahlgren J., Karlson T.L., Glader P., et al. Activated human T cells secrete exosomes that participate in IL-2 mediated immune response signaling. *PLoS One.* 2012; 7(11): 49723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049723>
23. Lotvall J., Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through ex-RNA. *Cell Adh. Migr.* 2007; 1(3): 156-8. <https://doi.org/10.4161/cam.1.3.5114>
24. Luscher-Dias T., Conceicao I.M., Schuch V., et al. Long non-coding RNAs associated with infection and vaccine-induced immunity. *Essays Biochem.* 2021; 65(4): 657-69. <https://doi.org/10.1042/EBC20200072>
25. Collier S.P., Collins P.L., Williams C.L., et al. Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells. *The Journal of Immunology.* 2012; 189: 2084-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200774>
26. Carpenter S., Aiello D., Atianand M.K., et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science.* 2013; 341: 789-92. <https://doi.org/10.1126/science.1240925>
27. Hu G., Tang Q., Sharma S., et al. Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nat. Immunol.* 2013; 14(11): 1190-8. <https://doi.org/10.1038/ni.2712>
28. Ranzani V., Rossetti G., Panzeri I., et al. The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. *Nat Immunol.* 2015; 16(3): 318-25. <https://doi.org/10.1038/ni.3093>
29. Lu T.X., Rothenberg M.E. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141(4): 1202-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>
30. Kroesen B.J., Teteloshvili N., Smigielska-Czepiel K., et al. Immuno-miRs: critical regulators of T-cell development, function and ageing. *Immunology.* 2015; 144(1): 1-10. <https://doi.org/10.1111/imm.12367>
31. Skogberg G., Gudmundsdottir J., van der Post S., et al. Characterization of human thymic exosomes. *PLoS One.* 2013; 8(7): 67554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067554>
32. Rodriguez A., Vigorito E., Clare S., et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007; 316: 608-11. <https://doi.org/10.1126/science.1139253>
33. Huffaker T.B., Hu R., Runtsch M.C., et al. Epistasis between MicroRNAs 155 and 146a during T Cell-Mediated Antitumor Immunity. *Cell Rep.* 2012; 2: 1697-709. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.025>
34. Huffaker T.B., O'Connell R.M. MiR-155-SOCS1 as a functional axis: Satisfying the burden of proof. *Immunity.* 2015; 43(1): 3-4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.020>
35. Baumjohann D. Diverse functions of miR-17-92 cluster microRNAs in T helper cells. *Cancer Lett.* 2018; 423: 147-52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.035>
36. Jiang S., Li C., Olive V., et al. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood.* 2011; 118: 5487-97. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355644>
37. Lazarevic V., Glimcher L.H. T-bet in disease. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 597-606. <https://doi.org/10.1038/ni.2059>
38. Steiner D.F., Thomas M.F., Hu J.K., et al. MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon- γ production in helper T cells. *Immunity.* 2011; 35(2): 169-81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.009>
39. Liston A., Papadopoulou A.S., Danso-Abeam D., et al. MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting the threshold. *Cell Mol. Life Sci.* 2012; 69(21): 3533-41. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1124-0>
40. Bishani A., Chernolovskaya E.L. Activation of Innate Immunity by therapeutic nucleic acids. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(24): 13360. <https://doi.org/10.3390/ijms222413360>
41. Yu A.M., Choi Y.H., Tu M.J. RNA drugs and RNA targets for small molecules: principles, progress, and challenges. *Pharmacol Rev.* 2020; 72(4): 862-98. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019554>
42. Yu A.M., Tu M.J. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacol Ther.* 2022; 230: 107967. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107967>
43. Zhang L., Hou D., Chen X., et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 2012; 22: 107-26. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.158>
44. Zhou Z., Li X., Liu J., et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res.* 2015; 25(1): 39-49. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.130>
45. Zhou L-K., Zhou Z., Jiang X-M., et al. Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients. *Cell Discov.* 2020; 6: 1-4. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00197-3>
46. Mulder W.J., Ochando J., Joosten L.A., et al. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019; 18: 553-66. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>
47. Pulendran B.S., Arunachalam P., O'Hagan D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021; 20: 454-75. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>
48. Kim H.J., Kwak H.W., Kang K.W., et al. MERS-CoV spike protein vaccine and inactivated influenza vaccine formulated with single strand RNA adjuvant induce T-cell activation through intranasal immunization in mice. *Pharmaceutics.* 2020; 12: 441. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050441>
49. Bang Y.J., Hong S.H., Park H.J., et al. Effective inactivated influenza vaccine for the elderly using a single-stranded RNA-based adjuvant. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 11981. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91445-3>

50. Zhang H., Weyand C.M., Goronzy J.J. Hallmarks of the aging T-cell system. *FEBS J.* 2021; 288(24): 7123-42. <https://doi.org/10.1111/febs.15770>
51. Rosales-Mendoza S., Salazar-González J.A. Do microRNAs play a role in the activity of plant-based vaccines? *Expert. Rev. Vaccines.* 2017; 16(6): 529-33. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1323636>
52. Yang J., Primo C., Elbaz-Younes I., et al. Bioavailability of transgenic microRNAs in genetically modified plants. *Genes Nutr.* 2017; 12: 17. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0563-5>
53. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., et al. Effects of preparations of total RNA from lymphoid cells of rat spleen on in vitro erythropoiesis. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya.* 2014; 4(12): 35-9. (In Russian)
54. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., et al. Influence of preparations of total RNA from splenic lymphoid cells on erythropoiesis in the culture of erythroblastic islets from rats with polycythemia. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya.* 2014; 4(12): 40-3. (In Russian)
55. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., et al. About hematopoietic properties of peripheral blood lymphocytes RNA from patients with polycythemia vera and healthy donors. *Oncohematology.* 2015; 10(2): 58-62. (In Russian)
56. Tishevskaya N.V., Golovneva E.S., Gallyamutdinov R.V., et al. Xenogeneic lymphocytic RNA stimulates skeletal muscle regeneration. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2021; 23(3): 134-41. (In Russian) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-3-134-141>
57. Myrzabekova M., Labeit S., Niyazova R., et al. Identification of bovine miRNAs with the potential to affect human gene expression. *Front Genet.* 2022; 12: 705350. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.705350>
58. Karalnik B.V. On the way to the individualization of vaccination: the importance of age and gender. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2021; 20(6): 88-99. (In Russian). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-88-99>

Сведения об авторах:

Тишевская Наталья Викторовна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. нормальной физиологии им. акад.

Ю.М. Захарова, e-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru;

Геворкян Нина Михайловна, науч. сотр. лаб. биосинтеза белков, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

© Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В., 2024

УДК 616-093/-098

Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В.**Современный взгляд на микробиом мочевыводящих путей**ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы,
129090, Москва, Россия, Большая Сухаревская пл., д. 3, корп. 1

В обзоре представлены последние данные о микробиоме мочевыводящих путей (МВП). Наличие резидентного микробиома МВП стало неожиданным открытием последних лет. Было обнаружено, что среди постоянных обитателей МВП преобладают медленно растущие трудно культивируемые виды, в том числе анаэробные бактерии. В связи с этим назрела насущная необходимость в пересмотре ряда аспектов общепринятых схем диагностики, картины патогенеза, терапевтических подходов в лечении инфекций мочевыводящих путей, ранее опиравшихся на представление о стерильности МВП. Разрабатывается концепция «здорового микробиома» МВП. Получила очередное подтверждение необходимость сопоставления микробиологических находок с клинической картиной заболеваний. Показано, что изменения в микробном сообществе кишечника напрямую влияют на микрофлору МВП. Поэтому одним из перспективных подходов терапии хронических инфекций мочевыводящих путей является создание сложных многокомпонентных синбиотиков, содержащих нормальных обитателей кишечного тракта и необходимые для их роста субстраты. Уже сейчас при комплексном лечении хронических инфекций мочевыводящих путей используют пробиотики, фекальную трансплантацию и специальные диеты. Лавинообразный рост числа работ по изучению микробиомов человека позволяет ожидать значительный прогресс в области практического применения результатов этих исследований в ближайшее время.

Ключевые слова: мочевыводящих путей; здоровый микробиом; хронические инфекции мочевыводящих путей; коррекция микробиомов; кишечная микрофлора; синбиотики

Для цитирования: Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В. Современный взгляд на микробиом мочевыводящих путей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(1): 138-144.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.138-144

Участие авторов: концепция, участие в организации процесса, написание текста статьи – Евдокимова Н.В.; корректировка и редактирование – Черненькая Т.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Евдокимова Наталья Витальевна, e-mail: env1111@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V.**A modern view of the urinary tract microbiome**N.V. Sklifosovsky Research institute of Emergency Medicine of the Moscow Healthcare Department,
3, bld. 1 Bolshaya Sukharevskaya, Moscow, 129090, Russian Federation

This review presents current reports on the urinary tract microbiome (UTM). Finding of a resident UTM has become an unexpected discovery in recent years. It was found that slow-growing, fastidious or nutritionally demanding species, including anaerobic bacteria, predominated among the UTM inhabitants. Thus, a vital need emerged to revise some aspects of generally accepted diagnostic schemes, the pathogenesis and approaches to the treatment of urinary tract infections, which had previously based on the idea of urinary tract sterility. The concept of a «healthy UTM» is being developed. The need to compare microbiological findings with clinical signs was confirmed again. Changes in the intestinal microbial community directly affect the urinary tract microflora. Therefore, one of the promising approaches to the treatment of chronic urinary tract infections is the creation of complex multicomponent synbiotics, that include normal inhabitants of the intestinal tract, and the substrates necessary for their growth. Already now, probiotics, fecal transplantation, and special diets are used in the complex treatment of chronic urinary tract infections. The avalanche-like growth in the number of human microbiome studies allows us to expect a significant progress in their practical application in the near future.

Keywords: urinary tract microbiome; healthy microbiome; chronic urinary tract infections; microbiome correction; intestinal microflora; synbiotics

For citation: Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V. A modern view of the urinary tract microbiome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 138-144. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.138-144

Author's contribution: participation in the organization of the process, writing the text – Evdokimova N.V.; correction and editing the text of the article approval – Chernenkaya T.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Natalya V. Evdokimova**, Senior Researcher at the Laboratory of Clinical Microbiology, PhD, Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Public Healthcare Institution of Moscow Healthcare Department, 3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129090, Russian Federation, e-mail: env1111@yandex.ru

Information about the authors:

Evdokimova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7473-8727>

Chernenkaya T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6167-7117>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 12.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Представление о стерильности мочевыводящих путей долгое время ни у кого не вызывало сомнений. В настоящее время благодаря достижениям в области высокопроизводительных технологий секвенирования и новых методов культивирования обнаружен широкий спектр микробных обитателей мочевыводящих путей. Наблюдаемый стремительный прогресс в микробиомных исследованиях позволяет с высокой степенью уверенности говорить о том, что результаты этих работ уже в ближайшем будущем будут использованы не только для диагностики, но и для разработки новых методов профилактики и лечения воспалительных патологий органов мочевыводящей системы. Это прежде всего касается хронических форм инфекций мочевыводящих путей, трудно поддающихся лечению в рамках старых классических подходов.

В данном обзоре мы попытались обобщить имеющиеся в свободном доступе (PubMed) сведения о микробиоме мочевыводящих путей (МВП), осветить некоторые аспекты патогенеза урологических инфекций, а также представить результаты применения этих данных для разработки методов профилактики и лечения инфекций мочевыводящих путей в амбулаторной и клинической практике.

«Здоровый микробиом»

С точки зрения микробной экологии, МВП представляют собой специфическую экологическую нишу, населенную резидентной микрофлорой, то есть микрофлорой, постоянно присутствующей в МВП. Такое представление сформировалось недавно и постоянно пополняется новыми доказательствами своей правомерности [1-5]. Имеющиеся данные о струк-

туре и строении микробиома МВП свидетельствуют о его чрезвычайной сложности и динамичности. Микробиом МВП непосредственно участвует в поддержании нормального функционирования мочевыводящей системы, защищая от проникновения чужеродной патогенной микрофлоры. Это динамичное равновесие могут нарушить любые стрессовые факторы, как внутренние, так и внешние. Стрессоустойчивость этой системы, в частности, определяется врожденными анатомическими особенностями, эффективностью работы иммунной системы, гормональным фоном, возрастными изменениями, образом жизни и т.д. У людей с любыми дисфункциями органов мочевыводящей системы отмечают значительные сдвиги в структуре и составе микробиомов [1-6].

В настоящее время продолжают работы по выработке критериев того, что считать нормальным микробиомом МВП. Как и в случае с кишечным микробиомом предполагается наличие «корового» микробиома, под которым подразумевают постоянно обитающие виды микроорганизмов [1]. Однако выявляемая чрезвычайная вариабельность состава микробиомов значительно затрудняет выработку критериев нормы или отклонений от нее. Как полагает ряд исследователей, использование экологического подхода, который подразумевает единство среды обитания и населяющих ее организмов, может помочь в решении этой задачи [5]. Представление об экологических нишах (эко-нишах), каждая из которых имеет специфический набор физико-химических факторов, обеспечивающих проживание в них конкретных сообществ микроорганизмов, кажется вполне здравым. Мочевыводящие пути традиционно подразделяют на верхние (включают почки и мочеточники) и нижние (мочевой пузырь и уретра). И действительно, с некоторой долей обоб-

щения, можно выявить свою специфику для каждого отдела МВП, обусловленную строением и свойствами эпителия, наличием клеток иммунной системы т.д. [1, 5]. Способность микроорганизмов заселять (колонизировать) ту или иную эконишу определяется такими факторами среды, как кислотность (рН), парциальное давление кислорода, осмотическое давление, наличие питательных веществ, специфических мест для адгезии микробных клеток [6, 7]. Сложный состав мочи (до 2600 органических и минеральных соединений, в том числе аминокислоты, углеводы разной степени сложности, а также фрагменты слущенного эпителия) может «перекрыть» пищевые потребности самых взыскательных микроорганизмов. Показано, что обнаруживаемые в моче представители рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Streptococcus* синтезируют широкий круг внеклеточных гидролитических ферментов, способных расщеплять муцин и другие сложные полимерные соединения, образующие внешний каркас клеток эпителия МВП [7].

Важным фактором является и «география» экотопов или их взаимное расположение. Существенный вклад в микробное население МВП вносит кишечная и влагалищная микрофлора [1, 7, 8].

Что показывают культуральные методы. Результаты исследований, проведенных стандартным методом посева мочи, свидетельствуют о том, что МВП здоровых людей в норме содержат небольшое количество микробных клеток — от 10 до 10^3 кл/мл [1]. В связи с этим всегда сохраняется угроза искажения результатов при несоблюдении жестких требований к процедуре отбора. Наиболее распространенный способ — отбор средней порции свободно вытекающей мочи, который прост и удобен, но всегда несет риск контаминации. Трансуретральный катетер и надлобковая пункция позволяют получить более аккуратные и сопоставимые результаты. Из этого следует более предпочтительный выбор катетера из-за большей, по сравнению с пункцией, простотой и безопасностью процедуры [1, 9]. В любом случае, все методы имеют свои преимущества и недостатки, поэтому в каждом конкретном случае приходится делать выбор.

В последнее десятилетие в исследовательских целях стали использовать так называемый расширенный метод культивирования проб мочи (англ. «enhanced quantitative urine culture, EQUС»), который включает посевы разных количеств мочи (0,01, 0,1, 1 мл и т.д.) на ряд сред с последующим культивированием в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях в течение не менее 5 сут [11]. Разработаны варианты EQUС разной степени «расширенности». Дальней-

шая видовая идентификация проводится с помощью 16S рРНК-секвенирования [10, 11]. Полученные результаты подтвердили суммарно небольшое количество клеток микроорганизмов (не более 10^3 кл/мл) в моче здоровых людей. Однако данные, полученные с помощью EQUС, показали, что при использовании классического культурального метода «недоучитывается» от 67 до 88 % видов [12]. Очевидно, что число выделяемых видов при использовании расширенного метода культивирования значительно возрастает потому, что при классическом методе выделения (посев на одну-две среды, аэробные условия, рост не более 24-48 ч) «пропускаются» медленно растущие, с особыми потребностями виды, микроаэрофильные и анаэробные микроорганизмы.

Сопоставление результатов EQUС с данными метагеномного анализа показало, что EQUС охватывает более 70% родов, обнаруженных с помощью методов метагеномики. При этом «не учтенными» оказались анаэробные бактерии, принадлежащие к типам *Actinobacteria* (роды *Propionimicrobium*, *Varibaculum*, *Atopobium*), *Firmicutes* (роды *Peptoniphilus*, *Megasphaera*, *Fingoldia*) или *Bacteroidetes* (род *Prevotella*) [1, 13]. В связи с этим открылся интересный аспект присутствия в МВП анаэробной микрофлоры, о которой ранее не вставал даже вопрос. Стоит заметить, однако, что при всех своих достоинствах расширенный культуральный метод (EQUС) является трудоемким, материалоемким и времязатратным, поэтому его использование в рутинной практике пока представляется малодоступным.

Метагеномные исследования. В настоящее время метагеномное секвенирование следующего поколения (англ. «new generation sequencing, NGS») является важным исследовательским инструментом в комплексном анализе ДНК и РНК бактерий, грибов и вирусов в клинических образцах. Разработан целый спектр методов прямого выделения и анализа генетического материала из различных биоматериалов. Это особая обширная область научных исследований со своей терминологией, методологией и даже философией. Для исследования клинических образцов материала из МВП (в основном, моча, реже пунктат) реализуют два основных подхода [14-16]. Первый состоит в выявлении конкретных родов и видов микроорганизмов с помощью ПЦР-секвенирования определенных вариабельных участков 16S рРНК (поиск ампликонов, заданных праймерами). Для исследования берется материал из колоний с последующим проведением расширенного культурального метода EQUС. Задачей второго подхода является обнаружение всех генети-

ческих микробных детерминант, выявление полного спектра микроорганизмов, даже тех, о существовании которых ранее было ничего не известно. Для этого используют полное секвенирование всего ДНК или РНК, выделенного из конкретного образца (англ. «whole-genome shotgun metagenomic sequencing, WGMS»). Задавая определенную глубину считывания (уровень детализации — до семейства, рода, вида и т.д.), можно получить всю картину микробного мира, даже выявить его функциональные или метаболические особенности. Большой помехой при этом является низкая микробная биомасса и загрязненность проб мочи генетическим материалом человека, поэтому возрастает роль технологий очистки от фонового загрязнения или обогащения микробным компонентом [15, 17]. Этап математической обработки полученных данных в рамках принятых в настоящее время биоинформационных подходов также не лишен «подводных камней». Результаты расчетов целиком определяются тем, на основании каких баз данных производился анализ, при этом дело даже не в полноте той или иной базы, а в принципах и методах формирования, глубине обработки данных и т. д. [16]. К тому же, несопоставимость результатов «отягощается» отсутствием свободного доступа ко всем базам. Указанные трудности, однако, никак нельзя считать непреодолимыми, и исследовательский потенциал методов метагеномики, метаболомики, метатранскриптомики и т. д. был и остается поистине неисчерпаем, о чем свидетельствует лавинообразный рост исследований и публикаций, наблюдаемый в последние годы.

Обычные обитатели мочевыводящих путей. Таксономическое профилирование микробиома МВП (определение конкретных обитателей) проводят, главным образом, с помощью ПЦР-секвенирования колоний клеток микроорганизмов, полученных в ходе проведения расширенного культурального метода EQUС, что позволяет выявлять реальные группы микроорганизмов, многие из которых неплохо изучены с точки зрения метаболических характеристик и клинической значимости.

Большинство таксонов, выделенных у здоровых людей, включают медленно растущие ауксотрофные (требующие добавление ростовых кофакторов) виды микроорганизмов, принадлежащие к пяти филам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* и *Proteobacteria*, в которые входят такие известные роды, как *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* [1, 10, 19]. При этом, как было сказано ранее, высокая индивидуальная (у каждого отдельного человека) вариабельность данных не по-

зволила сформировать даже приблизительный макет «корового» микробиома. Делаются попытки использовать кластерный анализ — выделить родственные в структурном отношении группы микробиомов на основании присутствия определенной группы микроорганизмов (приближенный аналог «корового» микробиома) [15]. Как было сказано выше, остается также не решенной проблема контаминации кожной микрофлорой при отборе материала без помощи катетера или пункции. В связи с этим ставится под сомнение надежность некоторых данных, например, высокая частота обнаружения в моче мужчин и женщин видов бактерий, относящихся к роду *Corynebacterium*, которые по своим характеристикам относятся к комменсалам кожи [1].

Исследование женского микробиома МВП, проведенного методом полного секвенирования (WGMS), показало несомненную связь микробиомов МВП и влагалища, а также преобладание у женщин детородного возраста в микробиомах МВП и влагалища бактерий рода *Lactobacillus* (видов *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и *L. jensenii*) [13]. Протекторная роль лактобацилл во влагалище общеизвестна, и наличие «зеркального» сообщества в МВП позволяет предполагать их сходную роль в ином экотопе. Интересно, что генетические детерминанты лактобактерий нередко обнаруживают и в моче мужчин [12, 15].

Большинство проведенных работ представляют собой одномоментные исследования разных категорий людей («cross-sectional»), не дающие представления о динамической устойчивости микробиомов. Кроме того, репрезентативность данных представляется также недостаточной. Попытки соотнести микробиомы с генотипом или фенотипом человека пока не увенчались успехом.

Возбудители инфекций МВП, знакомые и незнакомые. Инфекционные заболевания мочевыводящих путей были и остаются в числе ведущих патологий. В амбулаторной практике урологические инфекции чаще развиваются у детей и людей пожилого возраста. Особенно часто их диагностируют у женщин в период постменопаузы, что во многом связано с изменением состояния слизистых оболочек МВП на фоне гормональных перестроек [19]. У женщин во всех возрастных группах преобладают неосложненные формы, которые характеризуются отсутствием обструктивных структурных изменений в почках и мочевыводящих путях [20]. С помощью стандартных методов исследования (бактериологический посев) в качестве возбудителей, как правило, выявляют кишечную палочку, энтерококки, стафилококки и представителей семейства *Enterococ-*

bacteriaceae [15]. Исследования микробиома показали не только присутствие спектра известных бактериальных возбудителей неосложненных форм инфекций мочевыводящих путей, но и присутствие архей, вирусов, грибов и простейших (трихомонад) [1, 15].

Что касается клинической практики, то особо актуальной была и остается проблема развития осложненных форм урологических инфекций, приводящих даже к септическим состояниям. Так, по данным американских исследователей, в США число ежегодных обращений по поводу инфекционных заболеваний МВП в отделения неотложной помощи превышает 1 млн, при этом более 100 тыс. человек госпитализируют [21]. Доля осложненных форм урологических инфекций достигает 45%, при этом преобладают женщины (40%), из них 62% – старше 65 лет. Изменения в микробиоме МВП связаны не только с особенностями возбудителей инфекции, но и с инвазивными лечебно-диагностическими мероприятиями (введение катетера, антибиотикотерапия) [15]. С помощью расширенного метода культивирования (EQUIC) было показано, что у пациентов с уроинфекцией значительно чаще, чем у здоровых людей, выделяли *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Aerococcus urinae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus anginosus* [12]. Также обнаруживали дрожжеподобные грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*), а также *Clavispora lusitaniae*, *Lodderomyces elongisporus*, *Meyerozyma guilliermondii* и *Malassezia globosa* [1, 15]. В целом, микробиом МВП пациентов с признаками инфекционных воспалительных патологий отличался меньшим видовым разнообразием и доминированием представителей семейства *Enterobacteriaceae* [15]. Стоит заметить, что снижение видового разнообразия наблюдали в диапазоне от 30 до 50 родов микроорганизмов на 1 пробу мочи, что на порядок превышает значения, получаемые методом стандартного посева (не более 3–5 видов).

И еще о хронических инфекциях мочевыводящих путей. Лечение хронических урологических инфекций было и остается трудно решаемой задачей (главным образом амбулаторной практики). Относительно причин их возникновения, а также патогенеза до сих пор остается много вопросов и неясностей [22]. Источники постоянной инфекции могут находиться как вовне, так и внутри МВП. Безусловно существует наследственная и приобретенная «склонность» к урологическим инфекциям (например, анатомические особенности, иммунологическая недостаточность и т.д.). Ряд исследователей получили прямые доказательства наличия постоянно персистирующих популяций микроорганиз-

мов в стенках мочевого пузыря [23, 24]. Среди внешних источников наиболее вероятным резервуаром является кишечная микрофлора, и это предположение представляется небезосновательным [25]. Об этом, в частности, свидетельствуют успехи в лечении хронических инфекций мочевыводящих путей с помощью фекальной трансплантации [1]. Интересным кажется и подход, основанный на разработке лечебных диет на основе растительных волокон и богатых полиненасыщенными жирными кислотами продуктов, с помощью которых нормализуется состав кишечной микробиоты, а это приводит к накоплению метаболитов с противовоспалительным действием [26]. И хотя работы по исследованию метаболома (профиля микробных метаболитов) человека находятся еще на начальных стадиях, но уже имеющиеся данные говорят о возможности коррекции, например, ингибирование синтеза провоспалительных и активирование синтеза противовоспалительных метаболитов [27]. Показано, что применение пробиотиков и синбиотиков приводит к нормализации кишечной микробиоты, перестройке метаболического профиля и снижению частоты возникновения постоперационных осложнений [28].

Насколько значимо выявление генетических детерминант археобактерий в поддержании хронических урологических инфекций, пока остается неясным, хотя число таких находок растет с каждым годом [29, 1]. Обнаружение представителей филы *Methanobacteriota* свидетельствует о несомненной связи с кишечным микробиомом. Археи, относящиеся к филам *Thermoproteota* и *Halobacteriota*, являются типичными обитателями морей и засоленных лагун. Их присутствие вполне закономерно (моча содержит высокие концентрации NaCl), но каков их вклад в патогенез хронических уроинфекций, пока не изучено.

Нам кажется преждевременным говорить о роли и других редких видов микроорганизмов, например, *Acidovorax*, *Rhodanobacter*, *Actinotignum* и *Oligella*, названия которых мало что говорят большинству клинических микробиологов [1–5]. Конечно, любое расширение горизонтов познания только способствует формированию профессионального подхода, но систематика и классификация микроорганизмов постоянно развивается и пересматривается, поэтому эта информация зачастую носит временный характер. Сказанное особенно актуально для обширной группы анаэробов. Нам представляется более важным формирование целостной картины, выявление механизмов саморегулирования функций микробиомов, которые можно было бы соотнести с клинической картиной заболеваний.

Об антибиотиках. Положение о том, что антибиотикотерапия радикально меняет состав и структуру микробиомов, давно стало аксиомой. Изучение влияния антибиотиков на микробиом МВП показало, что их применение приводит к значительному сокращению видового разнообразия и росту числа полирезистентных госпитальных штаммов энтеробактерий [30]. Более того, после курса антибиотикотерапии никакие микробиомы (кишечника, влагалища, ротоглотки, кожи) не возвращаются к исходному состоянию [1-5]. Поэтому антибиотикотерапия должна применяться только при лечении *осложненных* форм инфекций мочевыводящих путей на основе проведения мониторинга возбудителей и их антибиотикограмм. В иных ситуациях, предпочтительнее применять уросептики, резистентность к которым пока развивается не столь быстро.

Заключение

Исследование микробиома МВП является примером синтеза метагеномных и культуральных подходов, взаимодополняющих и, в определенной степени, корректирующих друг друга. В результате проведенных исследований была обнаружена резидентная микрофлора мочевыводящих путей, о существовании которой ранее было не известно. Оказалось, что среди постоянных обитателей МВП преобладают медленно растущие трудно культивируемые виды, среди которых обнаружены и анаэробные бактерии. Из этого следует, прежде всего, необходимость разработки новых схем противомикробной терапии. Результаты изучения микробиома МВП заставляют по-новому взглянуть и на подходы микробиологической диагностики инфекций МВП (критерии этиологической значимости и т. д.). В свете новых данных о микробиоме МВП выделение нескольких видов микроорганизмов уже нельзя рассматривать как однозначное свидетельство загрязнения при нарушении технологии отбора. Результаты изучения микробиома МВП еще раз подтвердили сомнительную обоснованность антибактериальной профилактики «бессимптомного» носительства (необходимость строгого соотношения микробиологических находок с клинической картиной). Об этом многие годы говорили в рамках борьбы с распространением полирезистентных штаммов.

Знание того, как функционируют «здоровые микробиомы» МВП, должно являться основой того, что принято называть персонифицированным подходом в медицине. Восстановление «нормальной» структуры микробиома МВП, характерной именно для данного пациента, позволило бы скоординировать работу мочевыводящей системы, снять излиш-

нюю медикаментозную нагрузку. Для профилактики воспалительных заболеваний МВП или после завершения курса антибиотикотерапии уже сейчас применяются новые лечебные подходы на основе введения синбиотиков (пробиотики+ростовые субстраты) в желудочно-кишечный тракт, влагалище и непосредственно в МВП. Обнадеживающими являются положительные результаты коррекции микробиомов и лечения хронических уроинфекций с помощью фекальной трансплантации. Кроме того, ведутся исследования по созданию сложных многокомпонентных синбиотиков на основе представителей нормальной кишечной микрофлоры. Лечебные диеты также представляются весьма перспективными для проведения комплексной профилактики и терапии воспалительных заболеваний МВП. Интенсивность, с которой проводятся исследования микробиомов, и микробиома МВП в их числе, позволяет не только надеяться, но и утверждать, что то, что еще вчера казалось далеким будущим, на наших глазах становится явью.

Литература/References

1. Neugent M.L., Hulyalkar N.V., Nguyen V.H., Zimmern P.E., De Nisco N.J. Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *MBio*. 2020; 11(2): e00218- e00220. <https://doi.org/10.1128/mBio.00218-20>
2. Lloyd-Price J., Mahurkar A., Rahnavard G., Crabtree J., Orvis J., Hall A.B., et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 2017; 550(7674): 61–6. <https://doi.org/10.1038/nature23889>
3. Aragón I.M., Herrera-Imbroda B., Queipo-Ortuño M.I., Castillo E., Del Moral J.S.-G., Gómez-Millán J., et al. The urinary tract microbiome in health and disease. *Eur. Urol. Focus*. 2018; 4(1): 128–38. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2016.11.001>
4. Magistro G., Stief C.G. The urinary tract microbiome: the answer to all our open questions? *Eur. Urol. Focus*. 2019; 5(1): 36–8. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.06.011>
5. Gilbert J.A., Blaser M.J., Caporaso J.G., Jansson J.K., Lynch S.V., Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med*. 2018; 24(4): 392–400. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
6. Shannon M.B., Limeira R., Johansen D., Gao X., Lin H., Dong Q., et al. Bladder urinary oxygen tension is correlated with urinary microbiota composition. *Int. Urogynecol. J*. 2019; 30(8): 1261–7. <https://doi.org/10.1007/s00192-019-03931-y>
7. Amabebe E., Anumba D. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front. Med. (Lausanne)*. 2018; 5: 181. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00181> eCollection 2018
8. Reitzer L., Zimmern P. Rapid growth and metabolism of uropathogenic *Escherichia coli* in relation to urine composition. *Clin. Microbiol. Rev*. 2019; 33(1): e00101-e00119. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-19>
9. Marotz C.A., Sanders J.G., Zuniga C., Zaramela L.S., Knight R., Zengler K. 2018. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion. *Microbiome* 6: 42. doi: 10.1186/s40168-018-0426-3

10. Brubaker L., Wolfe A.J. The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(2): 34. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.62>
11. Hilt E.E., McKinley K., Pearce M.M., Rosenfeld A.B., Zilliox M.J., Mueller E.R., et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(3): 871–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.02876-13>
12. Price T.K., Dune T., Hilt E.E., Thomas-White K.J., Kliethermes S., Brincat C., et al. The clinical urine culture: enhanced techniques improve detection of clinically relevant microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54(5): 1216–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.00044-16>
13. Thomas-White K., Forster S.C., Kumar N., Van Kuiken M., Putonti C., Stares M.D., et al. Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nat. Commun.* 2018; 9(1): 1557. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03968-5>
14. Price T.K., Hilt E.E., Thomas-White K., Mueller E.R., Wolfe A.J., Brubaker L. The urobiome of continent adult women: a cross-sectional study. *BJOG.* 2020; 127(2): 193–201. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15920>
15. Moustafa A., Li W., Singh H., Moncera K.J., Torralba M.G., Yu Y., et al. Microbial metagenome of urinary tract infection. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 4333. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22660-8>
16. Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35(9): 833–44. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
17. Karstens L., Asquith M., Caruso V., Rosenbaum J.T., Fair D.A., Braun J., et al. Community profiling of the urinary microbiota: considerations for low-biomass samples. *Nat. Rev. Urol.* 2018; 15(12): 735–49. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0104-z>
18. Barraud O., Ravry C., Francois B., Daix T., Ploy M.C., Vignon P. Shotgun metagenomics for microbiome and resistome detection in septic patients with urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2019; 54(6): 803–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.009>
19. Medina M., Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther. Adv. Urol.* 2019; 11: 1756287219832172. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
20. Whelan S., Lucey B., Finn K. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms.* 2023; 11(9): 2169. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>
21. Zilberberg M.D., Nathanson B.H., Sulham K., Shorr A.F. Descriptive epidemiology and outcomes of emergency department visits with complicated urinary tract infections in the United States, 2016–2018. *J. Am. Coll. Emerg. Physicians Open.* 2022; 3(2):e12694. <https://doi.org/10.1002/emp2.12694>
22. Öztürk R., Murt A. Epidemiology of urological infections: a global burden. *World J. Urol.* 2020; 38(11): 2669–79. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-03071-4>
23. Baars C., van Ginkel C., Heesakkers J., Scholtes M., Martens F., Janssen D. The Burden of Urinary Tract Infections on Quality of Life and Healthcare in Patients with Interstitial Cystitis. *Healthcare (Basel).* 2023; 11(20): 2761. <https://doi.org/10.3390/healthcare11202761>
24. De Nisco N.J., Neugent M., Mull J., Chen L., Kuprasertkul A., de Souza Santos M., et al. Direct detection of tissue-resident bacteria and chronic inflammation in the bladder wall of postmenopausal women with recurrent urinary tract infection. *J. Mol. Biol.* 2019; 431(21): 4368–79. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.008>
25. Forde B.M., Roberts L.W., Phan M.D., Peters K.M., Fleming B.A., Russell C.W., et al. Population dynamics of an *Escherichia coli* ST131 lineage during recurrent urinary tract infection. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 3643. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11571-5>
26. Bolte L.A., Vich Vila A., Imhann F., Collij V., Gacesa R., Peters V., et al. Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. *Gut.* 2021; 70(7): 1287–98. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322670>
27. Chiba M., Tsuji T., Komatsu M. Therapeutic advancement in inflammatory bowel disease by incorporating plant-based diet. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 2023; 8: 38. <https://doi.org/10.21037/tgh-23-6 eCollection 2023>
28. Matzaras R., Anagnostou N., Nikopoulou A., Tsiakas I., Christaki E. The Role of Probiotics in Inflammation Associated with Major Surgery: A Narrative Review. *Nutrients.* 2023 Mar 8;15(6):1331. <https://doi.org/10.3390/nu15061331>
29. Kim Y.B., Whon T.W., Kim J.Y., Kim J., Kim Y., Lee S.H., et al. In-depth metataxonomic investigation reveals low richness, high inter-variability, and diverse phylotype candidates of archaea in the human urogenital tract. *Sci Rep.* 2023; 13(1): 11746. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38710-9>
30. Mulder M., Radjabzadeh D., Hassing R.J., Heeringa J., Uitterlinden A.G., Kraaij R., et al. The effect of antimicrobial drug use on the composition of the genitourinary microbiota in an elderly population. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1): 9. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1379-1>

Сведения об авторах:

Евдокимова Наталья Витальевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы, e-mail env1111@yandex.ru;

Черенькая Татьяна Витальевна, канд. мед. наук, зав. лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы.