

ISSN 0031-2991

---

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

---

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал  
Издается с 1957 г.



В.В. Пашутин  
(1845 – 1901)

PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY

2

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-media@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 2022 г.: 0,496

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 15.05.2024  
Подписано к печати 20.05.2024  
Опубликовано 14.06.2024

**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 № 2. 1–96.

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.

ISSN 0031-2991



«НИИ Общей патологии и патофизиологии»  
Общество патофизиологов

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал  
Основан в 1957 г.

Том 68 № 2 · 2024

Апрель–Июнь

**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. FS77-84858 dated March 21, 2023,  
issued by Federal Service for Supervision  
in the sphere of communications,  
information technology and mass  
Federal Service for Supervision  
in the Sphere of Telecom and Information  
Technologies and Mass 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 2022 was 0,496

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 15.05.2024  
Signed for publication on 20.05.2024  
Published on 14.06.2024

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

**ISSN 0031-2991**

Pat Fiziol Eksp Ter  
2024. Volume 68. No 2. 1–96.

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



5 770111 299011

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 № 2 · 2024  
April–June

**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. Efremov, *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

- Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М.** Половой диморфизм возрастных изменений функциональной активности и экспрессии классических калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2 в аорте и сердце крыс ..... 4
- Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Карпова М.Н., Кукушкин М.Л.** Влияние сочетанного воздействия изоляционного и холодового стресса на болевую чувствительность крыс ..... 13
- Семендяев А.А., Даренская М.А., Ступин Д.А., Колесников С.И., Семенова Н.В., Тухиева Д.В., Колесникова Л.И.** Оценка факторов ангиогенеза сыворотки крови у пациенток с первичным варикозом вен малого таза ..... 20
- Успенская М.С., Ляпина Л.А., Сороколетов С.М., Мурасhev В.В., Калугина М.Д.** Изучение антикоагулянтных эффектов экстрактов из корней пиона селекционного (Bartzella) ..... 28
- Лобанов А.В., Захарова И.А., Морозов С.Г.** Влияние гиперпродукции антител к белку фактора роста нервов у самок мышей во время беременности на развитие их потомства в гнездовом и раннем постгнездовом периодах развития ..... 34
- Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Политидис Р.Р.** Исходы коронавирусной пневмонии COVID-19 с поражением почек ..... 49
- Иванов А.Н., Сахань М.А., Ермаков А.В., Савкина А.А., Степанова Т.В., Никитина В.В., Ленгерт Е.В., Кириязи Т.С.** Влияние полилактидных раневых покрытий на редокс-статус при механической травме кожи у крыс ..... 57
- Саркисян Н.С., Куличенко А.Н.** Маркеры гемостаза и воспаления при бруцеллезной инфекции ..... 68

### ОБЗОРЫ

- Евдокимова Н.В., Черненко Т.В.** Микробиом кишечника человека: научная парадигма и клиническая практика ..... 76
- Васендин Д.В.** Ядерные рецепторы к мелатонину ..... 87

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- Sukhanova I.F., Kozhevnikova L.M.** Sexual dimorphism of age-related changes in the functional activity and expression of classical inward rectifying potassium channels Kir2 in the aorta and heart of rats ..... 4
- Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Karpova M.N., Kukushkin M.L.** Effects of the combined isolation stress and cold stress on pain sensitivity of rats ..... 13
- Semendyaev A.A., Darenskaya M.A., Stupin D.A., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Tukhieva D.V., Kolesnikova L.I.** Evaluation of serum angiogenesis factors in patients with pelvic venous incompetence ..... 20
- Uspenskaya M.S., Lyapina L.A., Sorokoletov S.M., Murashev V.V., Kalugina M.D.** Anticoagulant effects of root extracts from the breeding peony (Bartzella) ..... 28
- Lobanov A.V., Zakharova I.A., Morozov S.G.** Effect of nerve growth factor antibody overproduction in pregnant female mice on the development of their offspring in the nesting and early post-nesting periods of development ..... 34
- Aleksandrova S.G., Bychkova L.V., Aleksandrova M.R., Politidis R.R.** Outcomes of COVID-19 coronavirus pneumonia with kidney damage ..... 49
- Ivanov A.N., Sahan M.A., Ermakov A.V., Savkina A.A., Stepanova T.V., Nikitina V.V., Lengert E.V., Kiriyaazi T.S.** The effect of polylactide wound dressings on redox status during mechanical trauma to the skin of rats ..... 57
- Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N.** Markers of hemostasis and inflammation in brucellosis infection ..... 68

### REVIEW

- Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V.** The human gut microbiome: scientific paradigm shifts and clinical practice today and tomorrow ..... 76
- Vasendin D.V.** Nuclear melatonin receptors ..... 87

## Оригинальные статьи

© Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М., 2024  
УДК 616-092.9

Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М.

### Половой диморфизм возрастных изменений функциональной активности и экспрессии классических калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2 в аорте и сердце крыс

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

**Актуальность.** Биологическое старение признано наиболее значимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, которые остаются ведущей причиной смертности в мире. Исследования механизмов старения приобретают особую актуальность, поскольку с каждым годом увеличивается число людей преклонного возраста. До сих пор существуют значительные пробелы в понимании процессов, лежащих в основе старения сосудов и сердца, и практически отсутствуют данные о влиянии половой принадлежности на развитие возраст-ассоциированной патологии. В последние годы активно проводятся исследования роли ионных каналов в развитии различных заболеваний. Значительный прогресс достигнут в понимании вклада классических калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2.x в регуляцию сократимости сосудов и миокарда в норме, но нет четких представлений об их причастности к развитию возрастной патологии. Отсутствуют данные о половых особенностях возрастных изменений свойств этих каналов. **Цель исследования** – оценка влияния возраста и пола животных на функциональную активность и экспрессию Kir2.1 и Kir2.4 каналов в аорте и сердце крыс.

**Методика.** Исследования проводили на молодых (3 мес) и возрастных (18 мес) крысах самцах и самках породы Вистар. Силу сокращения изолированных фрагментов грудного отдела аорты измеряли в изометрическом режиме. Экспрессию генов *Kcnj2* и *Kcnj14* соответственно Kir2.1 и Kir2.4 каналов в аорте и в различных отделах сердца оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции.

**Результаты.** Инкубация сосудов с блокатором Kir2.x каналов  $BaCl_2$  (100 мкМ) приводила к усилению сократительной реакции аорты молодых крыс обоего пола в ответ на воздействие возрастающих концентраций серотонина ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М). Установлено, что в процессе старения у крыс самцов уменьшается вклад Kir2 каналов в формирование базального тонуса аорты, но сохраняется их причастность к реализации механизма отрицательной обратной связи, активируемого воздействием вазоконстрикторов. В отличие от самцов, в аорте самок Kir2 каналы не участвуют в регуляции базального тонуса. В процессе старения у самок утрачивается вовлеченность Kir2 каналов в отрицательную регуляцию сократительных ответов аорты. В аорте старых самцов уровень экспрессии генов *Kcnj2* и *Kcnj14* оставался неизменным, в то время как у самок наблюдалось двукратное снижение содержания мРНК каналов Kir 2.4. Установлено, что по сравнению с самками сердце самцов наиболее подвержено возрастным изменениям на уровне экспрессии генов *Kcnj2* и *Kcnj14* каналов Kir2.1 и Kir2.4. **Заключение.** Полученные данные позволяют предположить, что у особей женского пола в преклонном возрасте большая степень риска развития артериальной гипертензии, в то время как у мужского – патологии сердца. Выявленные половые различия следует учитывать при использовании модуляторов Kir2 каналов в качестве терапевтических средств коррекции сердечно-сосудистых заболеваний в старости.

**Ключевые слова:** старение; половой диморфизм; сократимость; аорта; миокард; калиевые каналы Kir2; экспрессия

**Для цитирования:** Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М. Половой диморфизм возрастных изменений функциональной активности и экспрессии классических калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2 в аорте и сердце крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(2): 4-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.4-12

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Кожевникова Л.М.; сбор и обработка материала, написание текста – Суханова И.Ф.; редактирование текста – Кожевникова Л.М. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

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

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

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

Поступила 04.04.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

Sukhanova I.F., Kozhevnikova L.M.

## Sexual dimorphism of age-related changes in the functional activity and expression of classical inward rectifying potassium channels Kir2 in the aorta and heart of rats

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

**Background.** Biological aging is recognized as the most significant risk factor for the development of cardiovascular diseases, which remain the leading cause of death in the world. Research into the mechanisms of aging is becoming particularly relevant as the number of elderly people increases every year. There are still significant gaps in understanding the processes underlying the aging of blood vessels and the heart, and there is virtually no data on the influence of gender on the development of age-associated pathology. In recent years, active research has been carried out on the role of ion channels in the development of various diseases. Significant progress has been made in understanding the contribution of the classical inward rectifying potassium channels Kir2.x to the regulation of vascular and myocardial contractility under normal conditions, but there is no clear understanding of their involvement in the development of age-related pathology. There is no data on gender-related changes in the properties of these channels. **The aim of the study** is to assess the effect of age and sex of animals on the functional activity and expression of Kir2.1 and Kir2.4 channels in the aorta and heart of rats.

**Methods.** The studies were carried out on young (3 months) and aged (18 months) male and female Wistar rats. The force of contraction of isolated fragments of the thoracic aorta was measured in isometric mode. The expression of the *Kcnj2* and *Kcnj14* genes, respectively, Kir2.1 and Kir2.4 channels in the aorta and in various parts of the heart was assessed using quantitative polymerase chain reaction.

**Results.** Incubation of vessels with the Kir2.x channel blocker BaCl<sub>2</sub> (100 μM) led to an increase in the contractile response of the aorta of young rats of both sexes in response to exposure to increasing concentrations of serotonin (10<sup>-7</sup> – 10<sup>-5</sup> M). It has been established that during the aging process in male rats, the contribution of Kir2 channels to the formation of the basal tone of the aorta decreases, but their involvement in the implementation of the negative feedback mechanism activated by the influence of vasoconstrictors remains. Unlike males, in the female aorta Kir2 channels are not involved in the regulation of basal tone. During the aging process in females, the involvement of Kir2 channels in the negative regulation of aortic contractile responses is lost. In the aorta of old males, the level of expression of the *Kcnj2* and *Kcnj14* genes remained unchanged, while in females a twofold decrease in the mRNA content of Kir 2.4 channels was observed. It was found that, compared with females, the heart of males is most susceptible to age-related changes at the level of expression of the *Kcnj2* and *Kcnj14* genes of the Kir2.1 and Kir2.4 channels.

**Conclusion.** The data obtained suggest that females in old age have a higher risk of developing arterial hypertension, while males have a higher risk of developing heart disease. The identified sex differences should be taken into account when using Kir2 channel modulators as therapeutic agents for the correction of cardiovascular diseases in old age.

**Keywords:** aging; sexual dimorphism; contractility; aorta; myocardium; Kir2 potassium channels; expression

**For citation:** Sukhanova I.F., Kozhevnikova L.M. Sexual dimorphism of age-related changes in the functional activity and expression of classical inward rectifying potassium channels Kir2 in the aorta and heart of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)* 2024; 68(2): 4-12. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.4-12

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

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

**Information about the authors:**

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

Sukhanova I.F., <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

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

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

Received 04.04.2024

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

### Введение

Согласно статистике, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний занимает лидирующую позицию на планете, а частота возникновения данных заболеваний увеличивается с возрастом [1, 2]. В процессе старения повышается жесткость сосудов, что приводит к недостаточной перфузии органов и, как следствие, к нарушению их функции [3-5]. С увеличением жесткости возрастает вклад магистральных сосудов в регуляцию артериального давления. Тонус сосудов и сократительная функция сердечной мышцы зависят от мембранного потенциала гладкомышечных клеток и кардиомиоцитов. Большое значение в поддержании мембранного потенциала электровозбудимых клеток имеют калиевые каналы внутреннего выпрямления (Kir каналы) [6, 7]. При мембранном потенциале более отрицательном, чем равновесный потенциал для ионов калия, Kir каналы поддерживают ток  $K^+$  внутрь клетки, обеспечивая возврат мембранного потенциала к потенциалу покоя. Каналы семейства Kir2.x функционируют в виде тетрамера порообразующих  $\alpha$ -субъединиц, являются конститутивно активными и демонстрируют высокую способность к входящему внутреннему выпрямлению [8, 9].

В гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов преимущественно экспрессируются Kir 2.1 и Kir 2.4 каналы и их вклад в поддержание миогенного тонуса во многом зависит от типа сосудов [10-13]. В сердце Kir2.x каналы экспрессируются в миоцитах желудочков и предсердий, включая волокна Пуркинье, и играют определяющую роль в регуляции сократимости миокарда [14-17]. Любые нарушения функции и аномалии генов Kir2.x каналов приводят к серьезным изменениям в работе сердца, вплоть до развития жизнеугрожающих аритмий, сопряженных с высоким риском летального исхода [18]. Вместе с тем до сих пор не ясно, как изменяются свойства Kir 2.1 и Kir 2.4 каналов в стареющих сосудах и сердце и нет четких представлений об их причастности к развитию возраст-ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, не изучена роль этих каналов в механизмах развития возрастной гиперчувствительности сосудов к действию эндогенных вазоконстрикторов. **Цель работы** – исследование влияния возраста и пола на функциональную активность и экспрессию Kir 2.1, Kir 2.4 каналов в аорте и сердце крыс.

### Методика

Эксперименты выполнены на крысах породы Вистар. Содержание лабораторных животных и экс-

перименты проводили в соответствии с национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и рекомендациями Этического комитета Института общей патологии и патофизиологии, протокол № 1а от 2 октября 2020 г.

**Физиологические методы исследования.** Животные были рандомизированы на группы: 1) молодые самцы 3 мес,  $n=14$ ; 2) старые самцы 18 мес,  $n=14$ ; 3) молодые самки 3 мес,  $n=12$ ; 4) старые самки 18 мес,  $n=12$ . Крыс после анестезии 25% раствором уретана (4 мл/кг) декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и сердце. Аорту помещали в раствор Кребса-Хенселейта, охлажденный до  $+4^{\circ}C$ , нарезали на кольца шириной 1,5-2,2 мм. Силу сокращения сосудов измеряли в изометрическом режиме на проволочном четырехканальном миографе (DanishMyo Technology, модель Multi Myograph System – 620M) как описано ранее [19]. После процедуры растяжения и последующего периода стабилизации в течение 40 мин жизнеспособность сосудов проверяли воздействием 0,1 мкМ норадrenalина – агониста адренорецепторов и 10 мкМ карбахола – агониста мускариновых рецепторов (Sigma, США). В экспериментах на подготовленных изолированных сосудах использовали агонист 5HT<sub>2</sub> рецепторов серотонина и селективный блокатор Kir2.x каналов  $BaCl_2$  (Sigma, США).

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

Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя праймеров. Праймеры для реакции были подобраны, синтезированы и валидированы ООО «ДНК-Синтез» (Россия) (см. табл.). ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 Cycloer-RealTime PCR Detec-

tion System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, США). Для нормализации уровней экспрессии генов использовали  $\beta$ -актин. Различия в экспрессии целевого гена оценивали по изменению соотношения уровней мРНК гена/мРНК  $\beta$ -актина. Результаты обрабатывали в Microsoft Excel с использованием алгоритма  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 8. Для сравнения средних значений и статистических различий между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Данные в тексте представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Расхождения считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

В работе оценивали влияние блокатора Kir2-каналов  $BaCl_2$  на сократимость колец аорты под действием возрастающих концентраций серотонина (5HT) молодых и старых крыс обоего пола. Причастность Kir2-каналов к развитию гиперчувствительности сосудов старых животных к действию 5HT ранее не изучалась. Как показано на рисунке 1 А, Б сосуды старых крыс самцов более чувствительны к вазоконстрикторному действию серотонина. Установлено, что предварительная инкубация колец грудного отдела аорты с  $BaCl_2$  (100 мкМ) приводила к достоверному повышению базального тонуса сосудов молодых крыс самцов и к значительному увеличению сократительного ответа на воздействие 5HT, о чем свидетельствовало смещение кривой зависимости «концентрация-эффект» влево (рис. 1, А). В отличие от молодых животных в присутствии блокатора Kir2 каналов в аорте старых крыс самцов не наблюдалось увеличения базального тонуса, но сохранялся эффект  $BaCl_2$  на силу сокращения сосудов в ответ на воздействие возрастающих концентраций 5HT (рис. 1, Б).

У молодых самок, как и у самцов, в присутствии  $BaCl_2$  отмечено смещение кривой зависимости «концентрация-эффект» влево в ответ на воздействие 5HT

на изолированные кольца аорты (рис. 1, В). Однако в отличие от самцов, оно было не столь выраженным и проявлялось только при добавлении 5HT в высоких концентрациях. Кроме того, у молодых самок не выявлено влияния блокатора Kir2 каналов на базальный тонус аорты (рис. 1, В). По мере старения сосудов у крыс самок утрачивалась способность калиевых каналов внутреннего выпрямления противодействовать чрезмерному сокращению сосудов в ответ на воздействие вазоконстрикторных соединений. Увеличение силы сокращения сосудов старых самок в ответ на добавление возрастающих концентраций 5HT было одинаковым как в присутствии, так и в отсутствие  $BaCl_2$  (рис. 1, Г).

В стареющих сосудах самцов уровень экспрессии генов *Kcnj2* и *Kcnj14* каналов Kir2.1 Kir2.4 остается неизменным (рис. 2). В отличие от самцов, в сосудах старых самок экспрессия генов *Kcnj14* каналов Kir2.4 значительно снижена.

В отличие от сосудов, в сердце старых крыс самцов выявлены значительные изменения на уровне экспрессии генов каналов Kir2.1 и Kir2.4. Как показано на рис. 3, А, в процессе старения в левом желудочке и левом предсердии крыс самцов значительно возрастает экспрессия *Kcnj2* (Kir2.1).

Во всех отделах сердца старых крыс самцов выявлен высокий уровень экспрессии генов каналов Kir2.4 по сравнению с аналогичными показателями молодых животных (рис. 3, А). В отличие от самцов, у старых самок рост экспрессии *Kcnj14* каналов наблюдается только в левом желудочке. Примечательно, что у старых самок в левом предсердии, снижено содержание мРНК каналов Kir2.1 и Kir2.4 (рис. 3, Б).

### Обсуждение

Изучение влияния возраста и пола на развитие сердечно-сосудистых заболеваний имеет важное стратегическое значение для разработки схем лечения воз-

#### Последовательности праймеров

##### Primer sequences

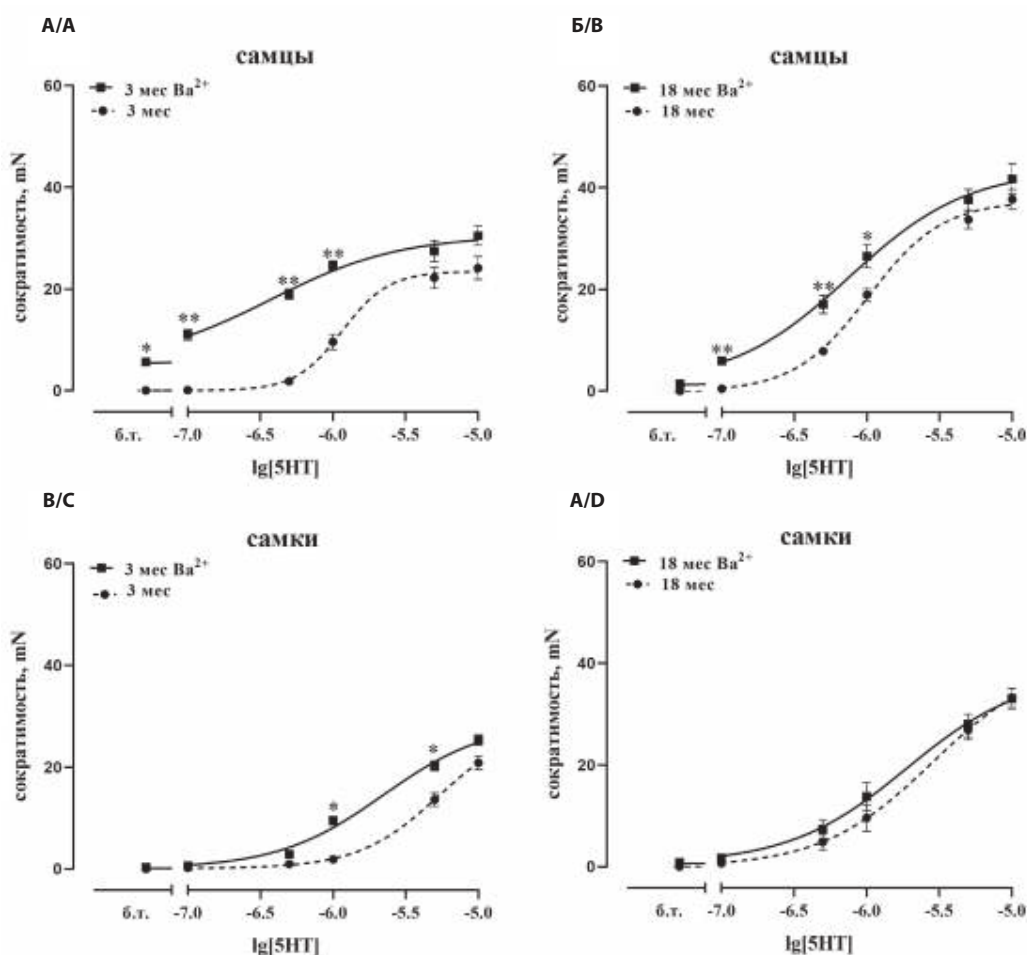
Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Праймер с флуоресцентным зондом
<i>Actb</i> (beta actin)	CTGACAGGATGCAGAAG-GAG	GATAGAGCCACCAATCCAC	FAM-CAAGATCATTTGCTCCTCCT-GAGC-BHQ1
<i>Kcnj2</i> (Kir2.1)	GCTGCCTTCCTTCTCTCCA	GATTGACTGGAATACCACCATG	FAM-CCAGACAACCATCGGCTATG-GTTTC-BHQ1
<i>Kcnj14</i> (Kir2.4)	CCGAAGTCACCTGGTGGAG	GTCAAAACCAACATCCACATCC	FAM-CAGCCCCGTGTGACCCAG-BHQ1



раст-ассоциированных заболеваний. В подавляющем большинстве случаев в основе развития возрастной сердечно-сосудистой патологии лежат нарушения на уровне функционирования рецепторов, ионных каналов, внутриклеточной сигнализации и кальциевого гомеостаза. Получение новых данных о механизмах физиологического старения и роли биологического пола приобретает особую актуальность для разработки профилактических и терапевтических стратегий для улучшения качества жизни лиц преклонного возраста. Старение сосудов и сердца и сопутствующие ему хронические заболевания в значительной степени являются «каналопатиями» [5, 16]. Важную роль в поддержании мембранного потенциала играют калиевые кана-

лы. По сравнению с другими ионными каналами в мировой литературе мало данных об изменении свойств классических калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2.x в стареющих сосудах и сердце. Сосудистые эффекты, обусловленные Kir2.x каналами, до сих пор наиболее изучены в резистивных сосудах [13, 20, 21].

В настоящем исследовании мы оценивали вклад Kir2 каналов в формирование базального и индуцированного тонуса аорты, поскольку с возрастом возрастает роль магистральных сосудов в регуляции системного кровотока. Установлено, что в процессе старения у крыс самцов уменьшается вклад Kir2 каналов в формирование базального тонуса аорты, но сохраняется их причастность к реализации меха-



**Рис. 1.** Влияние блокатора Kir2 каналов BaCl<sub>2</sub> (100 мкМ) на базальный тонус и сократительные ответы аорты крыс. Зависимости «концентрация-эффект» на воздействие 5HT на изолированные фрагменты аорты крыс самцов (А, Б) и самок (В, Г) в возрасте 3 и 18 мес в отсутствие и в присутствии BaCl<sub>2</sub>. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с группой без инкубации с BaCl<sub>2</sub>.

**Fig. 1.** Effect of the Kir2 channel blocker BaCl<sub>2</sub> (100 μM) on the basal tone and contractile responses of the rat aorta. Concentration-effect relationships on the effect of 5HT on isolated fragments of the aorta of male (A, B) and female (C, D) rats at the age of 3 and 18 months in the absence and presence of BaCl<sub>2</sub>. \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$  compared to the group without incubation with BaCl<sub>2</sub>.

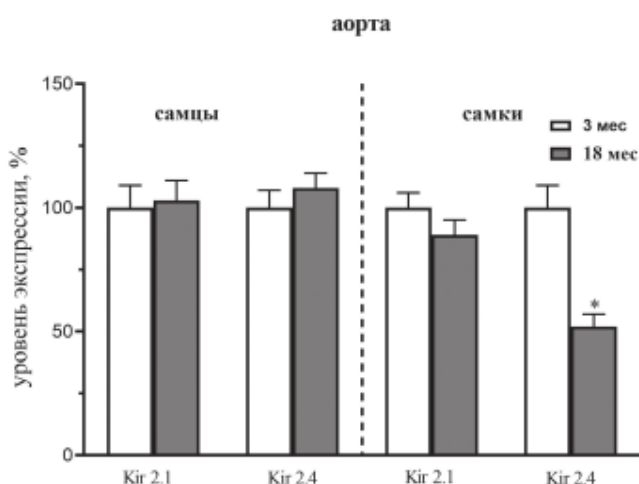
низма отрицательной обратной связи, активируемого воздействием вазоконстрикторов на сосуды. Пока не понятно, почему в процессе старения самцов утрачивается способность Kir2 каналов регулировать базальный тонус аорты. Известно, что Kir2 каналы модулируются фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом (PIP<sub>2</sub>) и холестерином [6, 22]. Возможно, что с возрастом в мембране гладкомышечных и эндотелиальных клеток нарушаются липид-белковые взаимодействия, которые могут негативно повлиять на функциональную активность Kir2 каналов и базальный тонус сосудов.

В отличие от самцов у самок независимо от возраста не было выявлено влияние Kir2 каналов на базальный тонус. Модулирующее влияние этих каналов на 5HT-индуцированное сокращение аорты в процессе старения самок полностью нивелировалось (рис. 1). Снижение функциональной активности Kir2 каналов, независимо от механизма, лежащего в его основе, может быть одним из факторов развития артериальной гипертензии у особей женского пола в старости.

Известно, что Kir2.1 и Kir2.4 каналы экспрессируются как в эндотелиальных, так и в гладкомышечных

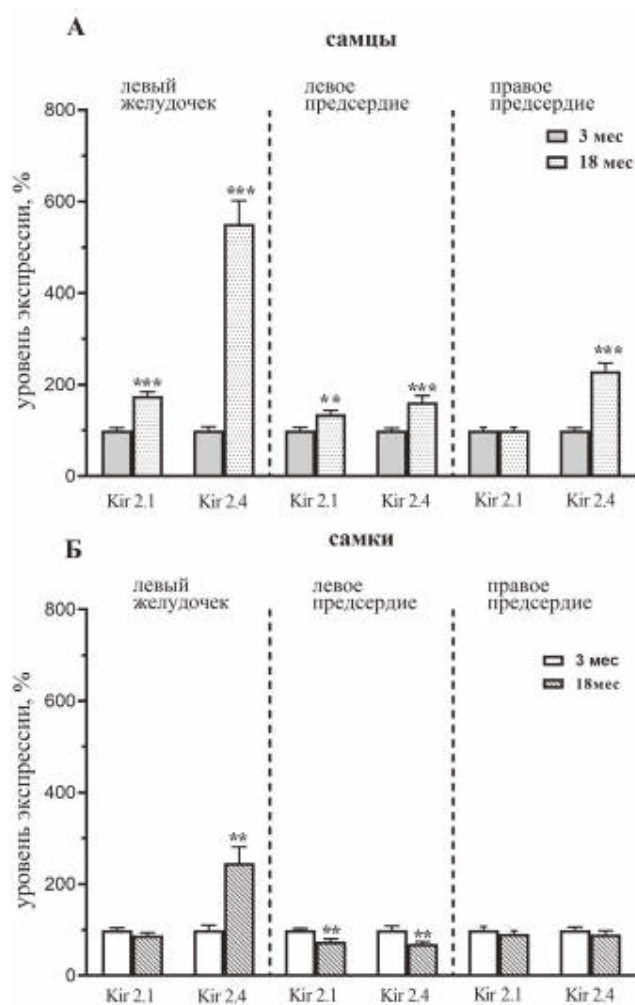
клетках сосудов [13, 23, 24]. Показано, что в аорте крысы и в эндотелиальных клетках аорты человека наиболее экспрессируемыми подтипами являются Kir2.2 и Kir2.4 [25]. В меньшем количестве экспрессируются Kir2.3 и 2.1 каналы. Обнаружено, что через Kir2.4 каналы проходит значительно больший ток ионов калия наружу по сравнению с Kir2.1, что свидетельствует о преобладающей роли этих каналов в поддержании потенциала покоя [26].

Результаты наших исследований показывают, что в аорте старых самок наблюдается двукратное снижение экспрессии мРНК генов Kir 2.4. Можно предпо-



**Рис. 2.** Влияние возраста на уровень экспрессии мРНК генов *Kcnj2* (Kir2.1) и *Kcnj14* (Kir2.4) в аорте крыс самцов и самок. Здесь и далее содержание мРНК каждого исследуемого белка выражено в процентах от среднего значения содержания того же белка в группе молодых крыс самцов или самок, принятого за 100%. \* –  $p < 0,01$  по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

**Fig. 2.** Effect of age on the level of mRNA expression of the *Kcnj2* (Kir2.1) and *Kcnj14* (Kir2.4) genes in the aorta of male and female rats. Here and below, the mRNA quantity of each protein under study is expressed as a percentage of the average quantity of the same protein in a group of young male or female rats, taken as 100%. \* –  $p < 0.01$  compared with rats aged 3 months.



**Рис. 3.** Влияние возраста на уровень экспрессии мРНК генов *Kcnj2* (Kir2.1) и *Kcnj14* (Kir2.4) каналов в сердце крыс самцов и самок. \* –  $p < 0,01$ , \*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\* –  $p < 0,0001$  по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

**Fig. 3.** Effect of age on the level of mRNA expression of the *Kcnj2* (Kir2.1) and *Kcnj14* (Kir2.4) channel genes in the heart of male and female rats. \* –  $p < 0.01$ , \*\* –  $p < 0.001$ , \*\*\* –  $p < 0.0001$  compared with rats aged 3 months.

ложить, что одной из причин возрастного снижения вклада Kir каналов в формирование агонист-индуцированного ответа аорты крыс самок является значительное уменьшение уровня экспрессии Kir2.4. Нарушения функции этих ионных каналов в процессе старения сосудов могут зависеть и от других факторов – жесткости сосудистой стенки, клеточной сигнализации, гипертрофии клеток и состояния клеточных мембран [5, 6, 8]. Кроме того, известно, что изменение функциональной активности Kir2.1 и Kir2.4 каналов может быть обусловлено их гетеродимеризацией, нарушением трафика, а также экспрессией неактивных сплайс вариантов белков [12, 27].

Калиевые каналы внутреннего выпрямления Kir2 являются важнейшим звеном формирования терминальной реполяризации сердца и играют значительную роль в поддержании стабильности потенциала покоя в кардиомиоцитах [7]. Считается, что потеря или изменение калиевого тока внутреннего выпрямления по Kir2 каналам является основным фактором, способствующим аритмогенезу у людей с сердечной недостаточностью [15, 16, 28, 29].

Усиление функции гена *KCNJ2* (Kir2.1) приводит к сокращению потенциала действия и, как следствие, к уменьшению продолжительности рефрактерного периода предсердий и желудочков. С помощью компьютерного моделирования было продемонстрировано, что усиление функции Kir2.1 канала обеспечивает инициацию и стабилизацию «роторов» фибрилляции [30]. Также было показано, что при дилатационной кардиомиопатии в левом желудочке и левом предсердии значительно повышались уровни экспрессии каналов Kir2.1, Kir2.3 и Kir2.4 [31]. Судя по результатам наших исследований, наиболее значимые изменения развиваются в стареющем сердце крыс самцов, о чем свидетельствует многократное повышение экспрессии мРНК генов Kir2.1 и Kir2.4 каналов в желудочке и предсердиях. С учетом данных литературы, можно предположить, что высокий уровень экспрессии генов *Kcnj2* и *Kcnj14* каналов Kir2.1 и Kir2.4 может негативно повлиять на калиевый ток внутреннего выпрямления в кардиомиоцитах, инициировать нарушения сократительной функции миокарда и способствовать развитию аритмий у особей мужского пола в старости.

По сравнению с самцами, у старых крыс самок в сердце изменения экспрессии мРНК каналов Kir2.1 и Kir2.4 были не столь выраженными (рис. 3). По-видимому, у самок значительные возрастные изменения функциональной активности и экспрессии классических калиевых каналов внутреннего выпрямления в сердце развиваются в более старшем возрасте,

чем у самцов. Согласно мировой литературе у пожилых женщин по мере старения в первую очередь развивается сосудистая патология, а у пожилых мужчин – сердечная [32–34]. Однако с течением времени половые различия возрастной сердечно-сосудистой патологии сглаживаются. Стоит отметить, что на преобладающий риск развития сердечной патологии у особей мужского пола в процессе старения указывали ранее полученные нами данные о более выраженных изменениях экспрессии риаинодиновых Ryr2 и инозитол-1,4,5-трисфосфатных IP3R1,2,3 рецепторов, их модуляторов кальмодулина и Erac2, а также калиевых каналов большой проводимости MaxIK в миокарде крыс самцов по сравнению с самками того же возраста (24 мес) [19, 35].

### Заключение

Таким образом, впервые продемонстрированы половые особенности возрастных изменений функциональной активности и экспрессии классических калиевых каналов внутреннего выпрямления. Показано, что только у крыс самок в процессе старения утрачивается защитная роль Kir2.x каналов от чрезмерного сокращения магистральных сосудов (аорты) на воздействие эндогенных вазоконстрикторов, что может вносить свой вклад в развитие артериальной гипертензии. Этот эффект затрагивает механизмы регуляции экспрессии генов, на что указывает снижение содержания мРНК Kir2.4 каналов в аорте старых самок. Отмечено, что сердце самцов наиболее подвержено возрастным изменениям экспрессии генов *Kcnj2* и *Kcnj14* каналов Kir2.1 и Kir2.4. С учетом данных литературы есть все основания полагать, что гиперэкспрессия этих каналов в различных отделах стареющего сердца самцов является предиктором развития дисфункции миокарда и возникновения желудочковых и предсердных аритмий в старости. Следовательно, при разработке новых подходов к профилактике и лечению возраст-ассоциированных заболеваний необходимо учитывать половые особенности возрастных изменений функциональной активности и экспрессии Kir2 каналов.

### Литература

(п.п. 1-18; 20-34 см. References)

19. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Половые различия возрастных изменений функциональной активности и экспрессии MaxIK каналов в аорте и сердце крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 4–12. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.4-12>
35. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Семенова Н.П., Крыжановский С.А. Половые различия возрастных изменений экспрессии риаинодиновых: Ryr2 и инозитол-1,4,5-трисфосфат-

ных: IP3R1,2,3 рецепторов и их модуляторов CaM и Ерас в аорте и миокарде крыс. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2020; 37(6): 453-65.

## References

- Niccoli T., Partridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol*. 2012; 22(17): R741-52. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>
- Vaduganathan M., Mensah G.A., Turco J.V., Fuster V., Roth G.A. The global burden of cardiovascular diseases and risk: a compass for future health. *J Am Coll Cardiol*. 2022; 80: 2361-71. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2022.11.005>
- Divo M.J., Martinez C.H., Mannino D.M. Ageing and the epidemiology of multimorbidity. *Eur Respir J*. 2014; 44: 1055-68. <https://doi.org/10.1183/09031936.00059814>
- Aguilar V.M., Paul A., Lazarko D., Levitan I. Paradigms of endothelial stiffening in cardiovascular disease and vascular aging. *Front Physiol*. 2023; 13: 1081119. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1081119>
- Behringer E. J. Impact of aging on vascular ion channels: perspectives and knowledge gaps across major organ systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023; 325(5): H1012-H1038. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00288.2023>
- Sancho M., Welsh D.G.  $K_{IR}$  channels in the microvasculature: Regulatory properties and the lipid-hemodynamic environment. *Curr Top Membr*. 2020; 85: 227-59. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2020.01.006>
- Reilly L., Eckhardt L.L. Cardiac potassium inward rectifier Kir2: Review of structure, regulation, pharmacology, and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2021; 18(8): 1423-34. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2021.04.008>
- Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol*. 2017; 7(2): 485-581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
- Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010; 90(1): 291-366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Guo Y., Waldron G.J., Murrell-Lagnado R. A role for the middle C terminus of G-protein-activated inward rectifier potassium channels in regulating gating. *J Biol Chem*. 2002; 277(50): 48289-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207987200>
- Schram G., Melnyk P., Pourrier M., Wang Z., Nattel S. Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol*. 2002; 544(2): 337-49. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.026047>
- Schram G., Pourrier M., Wang Z., White M., Nattel S. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovasc Res*. 2003; 59(2): 328-38. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00366-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00366-3)
- Li C., Yang Y. Advancements in the study of inward rectifying potassium channels on vascular cells. *Channels (Austin)*. 2023; 17(1): 2237303. <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2237303>
- Liu G.X., Derst C., Schlichthörl G., Heinen S., Seeböhm G., Brügemann A., et al. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol*. 2001; 532(Pt 1): 115-26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0115g.x>
- Nerbonne J.M. Molecular Basis of Functional Myocardial Potassium Channel Diversity. *Card Electrophysiol Clin*. 2016; 8(2): 257-73. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2016.01.001>
- Mages C., Gampp H., Syren P., Rahm A.K., André F., Frey N., et al. Electrical Ventricular Remodeling in Dilated Cardiomyopathy. *Cells*. 2021; 10(10): 2767. <https://doi.org/10.3390/cells10102767>
- Anumonwo J.M.B., Lopatin A.N. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48(1): 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.013>
- Borggreffe M., Wolpert C., Antzelevitch C., Veltmann C., Giustetto C., Gaita F., et al. Short QT syndrome. Genotype-phenotype correlations. *J Electrocardiol*. 2005; 38(4 Suppl): 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2005.06.009>
- Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F. Sex differences in age-related changes in the functional activity and expression of MaxiK channels in rat aorta and heart. 2023; 67(4): 4-12. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2023; 67(4): 4-12. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.4-12>
- Ko E.A., Han J., Jung I.D., Park W.S. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 2008; 44(2): 65-81. <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.65>
- Sackheim A.M., Villalba N., Sancho M., Harraz O.F., Bonev A.D., D'Alessandro A., et al. Traumatic brain injury impairs systemic vascular function through disruption of inward-rectifier potassium channels. *Function (Oxf)*. 2021; 2(3): zqab018. <https://doi.org/10.1093/function/zqab018>
- Sancho M., Fletcher J., Welsh D.G. Inward rectifier potassium channels: Membrane lipid-dependent mechanosensitive gates in brain vascular cells. *Front Cardiovasc Med*. 2022; 9: 869481. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.869481>
- Boerman E.M., Sen S., Shaw R.L., Joshi T., Segal S.S. Gene expression profiles of ion channels and receptors in mouse resistance arteries: Effects of cell type, vascular bed, and age. *Microcirculation*. 2018; 25(4): e12452. <https://doi.org/10.1111/micc.12452>
- Sancho M., Fabris S., Hald B.O., Brett S.E., Sandow S.L., Poepping T.L., et al. Membrane Lipid-K<sub>IR</sub>2.x channel interactions enable hemodynamic sensing in cerebral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39(6): 1072-87. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312493>
- Fang Y., Schram G., Romanenko V.G., Shi C., Conti L., Vandenberg C.A., et al. Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2. *Am. J. Physiol*. 2005; 289: C1134-C1144. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00077.2005>
- Tennant B.P., Cui Y., Tinker A., Clapp L.H. Functional expression of inward rectifier potassium channels in cultured human pulmonary smooth muscle cells: evidence for a major role of Kir2.4 subunits. *J Membr Biol*. 2006; 213(1): 19-29. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0037-y>
- Ohya S., Kito H., Hatano N., Muraki K. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression. *Pharmacol Ther*. 2016; 160: 11-43. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.001>
- Girmatsion Z., Biliczki P., Bonauer A., Wimmer-Greinecker G., Scherer M., Moritz A., et al. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2009; 6(12): 1802-9. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.08.035>
- Biliczki P., Girmatsion Z., Brandes R.P., Harenkamp S., Pitard B., Charpentier F., et al. Trafficking-deficient long QT syndrome mutation KCNQ1-T587M confers severe clinical phenotype by impairment of KCNH2 membrane localization: evidence for clinically significant

- IKr-IKs alpha-subunit interaction. *Heart Rhythm*. 2009; 6(12): 1792-801. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.08.009>
30. Noujaim S.F., Pandit S.V., Berenfeld O., Vikstrom K., Cerrone M., Mironov S., et al. Up-regulation of the inward rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol*. 2007; 578(Pt1): 315-26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.121475>
31. Szuts V., Ménesi D., Varga-Orvos Z., Zvara Á., Houshmand N., Bitay M., et al. Altered expression of genes for Kir ion channels in dilated cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013; 91(8): 648-56. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0413>
32. Al-Gburi S., Deussen A.J., Galli R., Muders M.H., Zatschler B., Neisser A., et al. Sex-specific differences in age-dependent progression of aortic dysfunction and related cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2017; 312 (5): R835–R849.
33. Kavousi M. Differences in epidemiology and risk factors for atrial fibrillation between women and men. *Front Cardiovasc Med*. 2020; 7: 3. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00003>
34. Aribas E., Roeters van Lennep J.E., De Rijke Y.B., Laven J.S.E., Ikram M.A., Peeters R.P., et al. Sex steroids and sex steroid-binding globulin levels amongst middle-aged and elderly men and women from general population. *Eur J Clin Invest*. 2022; 52(12): e13866. <https://doi.org/10.1111/eci.13866>
35. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Semenova N.P., Kryzhanovskii S.A. Sex differences in age-related changes in the expression of ryanodine receptors: RyR2 and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors: IP3R1,2,3 and of their modulators CaM and Epac in rat aorta and myocardium. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. 2020; 37(6): 453-65. (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0233475520050084>

**Сведения об авторах:**

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

**Кожевникова Любовь Михайловна**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП, e-mail: [lubovmih@yandex.ru](mailto:lubovmih@yandex.ru)

Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Карпова М.Н., Кукушкин М.Л.

## Влияние сочетанного воздействия изоляционного и холодового стресса на болевую чувствительность крыс

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

**Введение.** Воздействие изоляции и холода у человека и животных может протекать по типу стрессовой реакции на экстремальный раздражитель. Стресс является системной реакцией организма и оказывает модулирующее влияние на болевую чувствительность. Природа, продолжительность и интенсивность стрессорного воздействия во многом определяют характер изменения болевой чувствительности. Стресс оказывает разнонаправленное влияние на боль. В одних случаях, воздействие острого стресса приводит к снижению болевой чувствительности млекопитающих – стресс-аналгезии, в других – при повторных или хронических стрессорных нагрузках возникает стресс-индуцированная гипералгезия. Направленность изменения болевой чувствительности может отражать адаптивный или дезадаптивный характер приспособительных реакций.

**Цель исследования** – изучить особенности изменения болевой чувствительности у крыс самцов линии Вистар в тесте «Hot plate» в условиях сочетанного воздействия изоляционного и холодового стресса.

**Методика.** Оценку изменения индивидуальной болевой чувствительности у животных проводили с помощью стандартного анальгезиометрического теста «Hot plate». Животные были разделены на три группы: контрольные интактные животные, которые не подвергались никакому воздействию ( $n=12$ ); животные, подвергнутые воздействию изоляции ( $n=17$ ); животные, подвергнутые сочетанному воздействию изоляции и холода ( $n=17$ ). Для изучения воздействия изоляции животных из общей клетки помещали по одному в клетку на 4 часа в течение 8 дней и содержали при комнатной температуре  $23\pm 1^\circ\text{C}$ . Для изучения сочетанного воздействия изоляции и холода животных также из общей клетки помещали по одному в клетку на 4 часа при  $4^\circ\text{C}$  в течение 8 дней. Пороги болевой реакции (ПБР) измеряли до и после воздействия в 1-й и 8-й день, а также на следующий день (9-й день) после окончания эксперимента. У интактных контрольных животных измерение ПБР проводили в те же временные сроки, что и у животных, подвергшихся воздействию изоляции и холода.

**Результаты.** Изучение динамики болевой чувствительности по тесту «Hot plate» показало, что воздействие изоляции, а также сочетанного воздействия изоляции и холода вызывало снижение порогов болевой чувствительности – стресс-вызванную гипералгезию. Снижение ПБР в условиях сочетанного воздействия изоляции и холода более выражено по сравнению с воздействием только изоляции.

**Заключение.** Развитие стресс-индуцированной гипералгезии на изоляционный и холодовый стресс отражает дезадаптивный характер изменения болевой чувствительности.

**Ключевые слова:** порог болевой реакции; изоляционный стресс; холодовой стресс; крысы.

**Для цитирования:** Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Карпова М.Н., Кукушкин М.Л. Влияние сочетанного воздействия изоляционного и холодового стресса на болевую чувствительность крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(2): 13-19.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.13-19

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Кукушкин М.Л., Карпова М.Н.; сбор и обработка материала – Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю.; подготовка иллюстративного материала – Карпова М.Н., Кузнецова Л.В.; статистическая обработка данных – Кузнецова Л.В., Карпова М.Н.; написание текста – Карпова М.Н., Кукушкин М.Л.; редактирование – Кукушкин М.Л., Карпова М.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Карпова Маргарита Николаевна, e-mail: karpovamn@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБНУ «НИИОПП» темы НИР FGFU-2022-0013.

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

Поступила 05.03.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Karpova M.N., Kukushkin M.L.

## Effects of the combined isolation stress and cold stress on pain sensitivity of rats

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

**Background.** The effects of isolation and cold in humans and animals can occur as a stress response to an extreme stimulus. Stress is a systemic reaction of the body and has a modulating effect on pain sensitivity. The nature, duration, and intensity of stress exposure largely determine the pattern of changes in pain sensitivity. Stress exerts multidirectional effects on pain. In some cases, an exposure to acute stress leads to a decrease in the pain sensitivity of mammals, stress-induced analgesia, while in other cases associated with repeated or chronic stress, stress-induced hyperalgesia occurs. The direction of changes in pain sensitivity may reflect the adaptive or maladaptive nature of adaptive reactions.

**Aim.** To study the pattern of changes in pain sensitivity in male Wistar rats in the hot plate test under the conditions of combined isolation and cold stress.

**Methods.** Changes in individual pain sensitivity in animals were assessed using the standard analgesiometric hot plate test. Rats were divided into three groups: control intact, unstressed animals ( $n=12$ ); animals exposed to isolation ( $n=17$ ); and animals exposed to combined isolation and cold ( $n=17$ ). To study the effect of isolation, animals from a common cage were moved to individual cages for 4 hours per day during 8 days and kept at room temperature ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ). To study the combined effects of isolation and cold, animals from a common cage were also moved one at a time to a cage for 4 hours per day at  $4^\circ\text{C}$  during 8 days. Pain response thresholds (PRT) were measured before and after the exposure on days 1 and 8, as well as on the next day (day 9) after the end of experiment. In intact control animals, PRT was measured at the same time points as in animals exposed to isolation and cold.

**Results.** Studying the dynamics of pain sensitivity with the hot plate test showed that the exposure to isolation, as well as the combined exposure to isolation and cold, decreased the pain sensitivity thresholds, i.e., caused stress-induced hyperalgesia. The decrease in PRT under the conditions of combined isolation and cold was more pronounced compared to isolation alone.

**Conclusion.** The development of stress-induced hyperalgesia due to isolation and cold stress reflects the maladaptive nature of changes in pain sensitivity.

**Keywords:** pain response threshold; isolation stress; cold stress; rats

**For citation:** Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Karpova M.N., Kukushkin M.L. Effects of the combined isolation stress and cold stress on pain sensitivity of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 13-19. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.13-19

**Author's contribution:** the concept and design of the study – Kukushkin M.L., Karpova M.N.; collection and processing of material – Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu.; preparation of illustrative material – Karpova M.N., Kuznetsova L.V.; statistical processing – Kuznetsova L.V., Karpova M.N.; text writing – Karpova M.N.; editing – Kukushkin M.L., Karpova M.N. Approval of the final version of the article – all authors.

**For correspondence:** **Margarita N. Karpova**, DSc, Chief Researcher of the Laboratory of Fundamental and Applied Problems of Pain, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315, Russia, e-mail: karpovamn@gmail.com

### Information about the authors:

Kuznetsova L.V., <https://orcid.org/0000-0002-0691-3690>

Klishina N. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1348-1857>

Karpova M.N., <https://orcid.org/0000-0002-4338-5567>

Kukushkin M.L., <https://orcid.org/0000-0002-9406-5846>

**Financing.** The work was carried out with the financial support of Institute of General Pathology and Pathophysiology, research topic FGFU-2022-0013.

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

Received 05.03.2024

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

## Введение

Проблема взаимодействия боли и стресса на протяжении многих десятилетий является предметом многочисленных клинических и экспериментальных исследований. Неблагоприятные факторы внешней среды

сопровождаются изменением болевой чувствительности. Воздействие изоляции и холода у человека и животных может протекать по типу стрессовой реакции на экстремальный раздражитель. Как известно, стресс

является системной реакцией организма и оказывает модулирующее влияние на болевую чувствительность. Характер, продолжительность и интенсивность стрессорного воздействия являются ключевыми факторами, определяющими влияние стресса на болевую чувствительность [1, 2]. Острые и хронические стрессорные воздействия могут по-разному влиять на восприятие боли [1, 3]. Воздействие острого стресса приводит к снижению болевой чувствительности млекопитающих – стресс-аналгезии, основной механизм которой опосредован стимуляцией эндогенных антиноцицептивных систем [1, 4, 5]. Стресс-индуцированная анальгезия опосредована активацией нисходящего пути торможения боли. Фармакологические и нейрохимические исследования продемонстрировали участие большого количества нейротрансмиттеров и нейропептидов. В частности, ключевую роль играют эндогенные опиоиды, моноаминовая, каннабиноидная,  $\gamma$ -аминомасляная и глутаматная системы [3].

С другой стороны, при повторных или хронических стрессорных нагрузках возникает стресс-индуцированная гипералгезия.

Одним из решающих факторов для возникновения стресс-индуцированной анальгезии или стресс-индуцированной гипералгезии является психологический статус – наличие или отсутствие тревоги, катастрофизации, которые существенным образом влияют на болевую реакцию [6, 7]. Показано, что стрессорное воздействие усиливает боль у пациентов, страдающих хроническими болевыми синдромами [1]. У пациентов с фибромиалгией психологический стресс приводит к развитию стресс-индуцированной аллодинии/гипералгезии в ответ на холодные раздражения [8]. Иными словами, направленность изменения болевой чувствительности при действии стрессорных факторов во многом будет зависеть не только от вида, интенсивности и длительности стрессорного воздействия, но и от индивидуальных особенностей организма.

Реакция человека на стрессорное воздействие рассматривается в качестве одного из ведущих этиологических факторов в хронизации боли. Патогенез хронических болевых синдромов до последнего времени остается не до конца изученным. Формирование устойчивой сенситизации ноцицептивных нейронов в центральной нервной системе при хронической боли связывают не столько с повреждением тканей, сколько с психологическим состоянием пациента, его отношением к ситуации (феномен катастрофизации, неадаптивные копинг-стратегии) [9]. Поэтому уникальный характер изменения болевой чувствительности при стрессе может служить прогностическим маркером

при оценке риска развития хронической боли. Ранее нами было показано разнонаправленное изменение порогов болевой реакции в тесте «Tail flick» в ответ на сочетанное стрессорное воздействие изоляции и холода у крыс самцов породы Вистар [10].

**Цель** настоящего исследования – изучить особенности изменений болевой чувствительности в тесте «Hot plate» в условиях сочетанного стрессорного воздействия изоляции и холода у крыс самцов линии Вистар.

### Методика

Эксперименты выполнены на крысах самцах линии Вистар ( $n=46$ ) с массой 240–280 г. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г., и Межгосударственными стандартами ГОСТ 33215–2014, ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», соответствующими Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006). Исследования проводили под контролем Этического комитета ФГБНУ НИИОПП (протокол № 1 от 23.01.2024 г.). Животных содержали по 5–6 особей в клетке размером 52,5×32,0×20,0 см в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещенности и свободным доступом к воде и пище (сухой сбалансированный корм производства ООО «Лабorkорм», Россия).

Животные были разделены на три группы: контрольные интактные животные, которые не подвергались никакому воздействию ( $n=12$ ); животные, подвергнутые воздействию изоляции ( $n=17$ ); животные, подвергнутые сочетанному воздействию изоляции и холода ( $n=17$ ).

Оценку изменения порогов болевой реакции (ПБР) у животных проводили с помощью стандартного анальгезиометрического теста горячей пластины «Hot plate». Оценка болевой чувствительности с помощью этого теста используется для определения особенностей регуляции болевой чувствительности на уровне центральных структур мозга. Измерение ПБР проводили при помощи прибора «TSE Systems» (Германия), позволяющего регулировать нагрев пластины и фиксировать время появления болевого поведения животного. Величина ПБР измерялась в секундах по латентному периоду (ЛП), через которое животное, находящееся на нагретой до 55°C металлической пластине, начинало



облизывать заднюю лапу или подпрыгивать (выпрыгивать). Принимая во внимание тот факт, что болевые пороги у грызунов подвержены циркадным колебаниям, оценку ноцицепции проводили в одно и то же время суток.

Для изучения воздействия изоляции животных из общей клетки помещали по одному в клетку размером 21,0×14,5×14,0 см на 4 ч в течение 8 дней и содержали при комнатной температуре 23±1 °С. Для изучения сочетанного воздействия изоляции и холода животных также из общей клетки помещали по одному в клетку и содержали в холодной комнате при t=4±1°С на 4 ч в течение 8 дней. Пороги болевой реакции (ПБР) измеряли в 10 часов до и через 1 ч после воздействия в 1-й и 8-й день, а также на следующий день (9-й день) после окончания эксперимента. У интактных контрольных животных измерение ПБР проводили в те же временные сроки, что и у животных, подвергшихся воздействию изоляции и холода.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «Statistica 8.0». Оценка значимости показателей и различий рассматриваемых выборок проводили по U-критерию Манна–Уитни для независимых выборок и по Критерию Т (парному критерию Вилкоксона) для связанных выборок. В качестве средневыборочной характеристики использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1; Q3) Статистически значимыми считали различия между группами при p<0,05.

### Результаты

Оценка индивидуальной болевой чувствительности по тесту «Hot plate» показала, что исходные показатели порога болевой реакции (ПБР) у животных всех групп не отличались. У контрольных животных, не подвергавшихся никакому воздействию, ПБР не изменялись на протяжении всего эксперимента (рис. А).

Изоляция животных приводила к развитию гипералгезии уже в 1-й день и сохранялась на протяжении всего эксперимента (рис. Б).

Сочетанное воздействие изоляции и холода также сопровождалось снижением ПБР, начиная с 1-го дня эксперимента и до его окончания. Выраженность гипералгезии у животных, подвергнутых изоляции и холоду, была статистически значимо выше по сравнению с группой животных, подвергшихся только изоляции (рис. В).

Таким образом, наблюдение за динамикой изменения болевой чувствительности по тесту «Hot plate» показало, что воздействие изоляции, а также сочетанное

воздействие изоляции и холода, вызывает снижение ПБР, т. е. развитие стресс-вызванной гипералгезии.

### Обсуждение

Нейробиологические механизмы, лежащие в основе стресс-вызванной гипералгезии мало изучены. Возникновение стресс-вызванной гипералгезии связывают с повышенным высвобождением провоспалительных медиаторов в спинном мозге [11]. В зависимости от природы и продолжительности действия стрессора могут усиливаться иммунные реакции посредством периферической продукции провоспалительных цитокинов, включая IL-1β или IL-6 [12]. Стресс-вызванная гипералгезия может быть следствием активации микроглии. Показано, что ингибирование активации микроглии миноциклином значительно снижает гипералгезию, вызванную посттравматическим стрессовым расстройством [13]. Имеются также сообщения о дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и некоторых нейромедиаторных систем в центральной нервной системе, включая эндогенную опиоидную, серотонинергическую и норадренергическую системы [14]. Стресс может влиять на передачу ноцицептивных сигналов посредством изменений активности нейронов в дорзальных рогах спинного мозга, активируя структуры коры головного мозга, миндалевидное тело, около водопроводное серое вещество, росто-вентро-медиальный отдел продолговатого мозга [1]. Нисходящие облегчающие влияния на болевую чувствительность при стрессе опосредуются дорсолатеральными канатиками спинного мозга и реализуют свои эффекты посредством выделения серотонина и холецистокинина [15].

Имеются многочисленные публикации, свидетельствующие о негативном влиянии психологических стрессоров на болевой порог у испытуемых [8]. Отношение больных или испытуемых к происходящим событиям (наличие или отсутствие тревоги, катастрофизации) разнонаправленно влияют на болевую чувствительность.

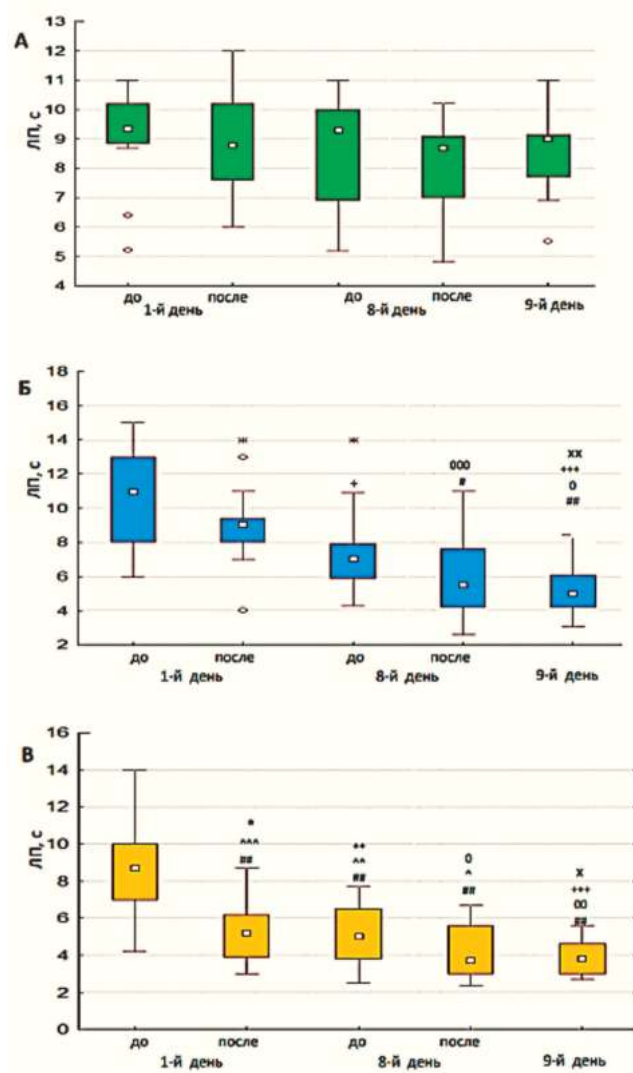
Наиболее изученными формами модуляции боли, вызванной ожиданием, являются эффекты плацебо и ноцебо — соответственно уменьшение и увеличение восприятия боли [16]. Исследования с использованием позитронно-эмиссионной томографии и функциональной магнитно-резонансной томографии выявили, что плацебо гипоалгезия, вызванная положительными ожиданиями, приводит к высвобождению эндогенных опиоидов в областях мозга, участвующих в нисходящем торможении боли, включая орбитофронтальную

кору, дорсолатеральную префронтальную кору, рорстральную переднюю поясную извилину и периакведуктальное серое вещество [17]. Нисходящие нейронные влияния из передней цингулярной коры, инсулы, сенсомоторной коры, гиппокампа, островка, амигдалы и периакведуктального серого вещества участвуют в реализации ноцебо гипералгезии [18].

Считается, что уравнение «усиление-торможение» передачи ноцицептивного сигнала всегда неопределенно и может быть взвешено либо в пользу, либо против прохождения болевого импульса с помощью множества механизмов нисходящего супраспинального торможения или усиления активности ноцицептивных нейронов дорзального рога [19].

Ранее в аналогичных методических условиях нами было показано, что сочетанное стрессорное воздействие изоляции и холода вызывает у части крыс снижение ПБР, у других животных – повышение ПБР, умеренных при помощи теста «Tail flick» [10].

В настоящем исследовании в тесте «Hot plate» мы не обнаружили разнонаправленных индивидуальных реакций животных в условиях сочетанного воздействия изоляционного и холодового стресса. У всех животных наблюдалось снижение ПБР, то есть развивалась стресс-индуцированная гипералгезия. Отмеченные различия, скорее всего, связаны с особенностями механизмов регуляции ноцицептивных рефлексов. Оценка болевой чувствительности с помощью теста одергива-



Изменение порогов болевой реакции у крыс самцов линии Вистар в условиях сочетанного воздействия изоляционного и холодового стресса, Me (Q1; Q3)

А – контрольные интактные животные; Б – животные, подвергнутые воздействию изоляции; В – животные, подвергнутые сочетанному воздействию изоляции и холода. ЛП – латентный период появления болевой реакции; \*  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим показателем до сочетанного воздействия изоляции и холода; +  $p = 0,052$ , ++  $p = 0,001$ , +++  $p < 0,001$ , по сравнению с соответствующим показателем 1-го дня до воздействия; <sup>0</sup>  $p = 0,02$ , <sup>00</sup>  $p = 0,011$ , <sup>000</sup>  $p = 0,003$  по сравнению с соответствующим показателем 1-го дня после воздействия; \*  $p = 0,044$ , <sup>x</sup>  $p = 0,017$  по сравнению с соответствующим показателем 8-го дня до воздействия; ^  $p = 0,049$ , ^^  $p = 0,004$ , ^^  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующими показателями группы изоляция; #  $p = 0,014$ , ##  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующими показателями интактного контроля.

Pain threshold changes in male Wistar rats under conditions of combined exposure to isolation and cold stress, Me (Q1; Q3).

A – control intact animals; Б – animals exposed to isolation; В – animals exposed to isolation and cold. LP – latent period of the appearance of pain reaction; \*  $p < 0,001$  compared with the corresponding values before combined exposure to isolation and cold; +  $p = 0,052$ , ++  $p = 0,001$ , +++  $p < 0,001$  compared with the corresponding values of the 1st day before exposure; <sup>0</sup>  $p = 0,02$ , <sup>00</sup>  $p = 0,011$ , <sup>000</sup>  $p = 0,003$  compared with the corresponding values on the 1st day after exposure; \*  $p = 0,044$ , <sup>x</sup>  $p = 0,017$  compared with the corresponding values on the 8th day before exposure; ^  $p = 0,049$ , ^^  $p < 0,004$ , ^^  $p < 0,001$  compared with the corresponding values of the isolation group; #  $p = 0,014$ , ##  $p < 0,001$ , compared to corresponding values of intact control.

ния хвоста — «Tail flick» позволяет оценить особенности регуляции болевой чувствительности на уровне сегментарных отделов спинного мозга. Тест «Hot plate» связан с оценкой поведенческих болевых реакций, формирующихся в результате тесного взаимодействия спинальных и супраспинальных механизмов и используется для определения особенностей регуляции болевой чувствительности на уровне центральных структур мозга [20, 21]. Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что тест «Hot plate» является менее чувствительным по сравнению с тестом «Tail flick» в отношении оценки индивидуальных изменений болевой чувствительности при стрессорных воздействиях, поскольку в данном случае вовлекаются более сложные механизмы регуляции болевой чувствительности.

### Заключение

В совокупности, результаты настоящего исследования и полученные нами ранее данные позволяют полагать, что индивидуальная направленность изменения болевой чувствительности на стресс может быть использована в качестве маркера на выявление предрасположенности животных к развитию хронической боли. Развитие стресс-индуцированной гипералгезии на изоляционный и холододовый стресс отражает дезадаптивный характер изменения болевой чувствительности.

### Литература

(п.п. 1; 3-6; 8; 11-19; 21 см. References)

2. Алексеева И.В., Абрамова А.Ю., Перцов С.С. Ноцицептивная чувствительность в условиях стрессорных воздействий. *Российский журнал боли*. 2022; 20(3): 42-51. <https://doi.org/10.17116/pain2022200314>
7. Крупина Н.А., Графова В.Н., Смирнова В.С., Орлова И.Н., Хлебникова Н.Н., Родина В.И. и др. Изменение болевой чувствительности у крыс с исходно различным тревожно-фобическим уровнем в процессе развития экспериментального болевого синдрома. *Боль*. 2005; 1: 38-43.
9. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: медико-биологические и социально-экономические аспекты. *Вестник РАМН*. 2012; 9: 54-8.
10. Кузнецова Л.В., Карпова М.Н., Клишина Н.Ю., Кукушкин М.Л. Влияние холододового стресса на болевую чувствительность крыс. *Российский журнал боли*. 2023; 21(3): 5-10. <https://doi.org/10.17116/pain2023210315>
20. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

### References

1. Jennings E.M., Okine B.N., Roche M., Finn D.P. Stress-induced hyperalgesia. *Prog Neurobiol*. 2014; 121: 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.06.003>

2. Alekseeva I.V., Abramova A.Yu., Pertsov S.S. Nociceptive sensitivity under stress influence. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2022; 20(3): 42-51. (In Russian) <https://doi.org/10.17116/pain20222003142>
3. Butler R.K., Finn D.P. Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology* 88. 2009; 184-202. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003>
4. Stein C. Opioid Receptors. *Annu Rev Med*. 2016; 67: 433-51. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093100>
5. Ferdousi M., Finn D.P. Stress-induced modulation of pain: Role of the endogenous opioid system. *Prog Brain Res*. 2018; 239: 121-77. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2018.07.00218>
6. Bella A., Diego A.M., Finn D.P., Roche M. Stress-induced changes in nociceptive responding post-surgery in preclinical rodent models. *Front. Pain Res*. 2023; 3: 1106143. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.1106143>
7. Krupina N.A., Grafova V.N., Smirnova V.S., Orlova I.N., Khlebnikova N.N., Rodina V.I., et al. Changes in pain sensitivity in rats with initially different anxiety-phobic levels during the development of experimental pain syndrome. *Bol'*. 2005; 1: 38-43. (In Russian)
8. Crettaz B., Marziniak M., Willeke P., Young P., Hellhammer D., Stumpf A., et al. Stress-induced allodynia--evidence of increased pain sensitivity in healthy humans and patients with chronic pain after experimentally induced psychosocial stress. *PLoS One*. 2013; 7: 8(8): e69460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069460>
9. Yakhno N.N., Kukushkin M.L. Chronic pain: biomedical and socio-economic aspects. *Annaly RAMN*. 2012; 9: 54-8. (In Russian)
10. Kuznetsova L.V., Karpova M.N., Klishina N.Yu., Kukushkin M.L. Effect of cold stress on pain sensitivity in rats. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2023; 21(3): 5-10. (In Russian)
11. Suarez-Roca H., Quintero L., Avila R., Medina S., De Freitas M., Cardenas R. Central immune overactivation in the presence of reduced plasma corticosterone contributes to swim stress-induced hyperalgesia. *Brain Res. Bull*. 2013; 100: 61-9.
12. Elenkov I.J., Chrousos G.P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; 966: 290-303.
13. Qi J., Chen C., Meng Q.X., Wu Y., Wu H., Zhao T.B. Crosstalk between activated microglia and neurons in the spinal dorsal horn contributes to stress-induced hyperalgesia. *Sci Rep*. 2016; 6: 39442. <https://doi.org/10.1038/srep39442>
14. Imbe H., Iwai-Liao Y., Senba E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci*. 2006; 11: 2179-92. <https://doi.org/10.2741/1960>
15. Westlund K.N. Chapter 9. The dorsal horn and hyperalgesia. *Handb Clin Neurol*. 2006; 81: 103-25. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(06\)80013-8](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(06)80013-8)
16. Yanes J.A., Akintola T. Parabrachial projections to PAG-RVM Axis may promote placebo hypoalgesia and nocebo hyperalgesia. *J Neurosci*. 2022; 42(16): 3302-4. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2544-21.2022>
17. Bingel U., Tracey I. Imaging CNS modulation of pain in humans. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 23: 371-80. <https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2008>. PMID: 19074744
18. Rossetini G., Campaci F., Bialosky J., Huysmans E., Vase L., Carli-no E. The biology of placebo and nocebo effects on experimental and chronic pain: State of the Art. *J Clin Med*. 2023; 12(12): 4113. <https://doi.org/10.3390/jcm12124113>

19. Millan M.J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002; 66(6): 355-474. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00009-6)
20. Mironov A.H., Bunatyan N.D., Vasiliev A.N., et al. *Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part 1. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow: Grif and K. 2012. (In Russian)
21. Santenna C., Sunil K., Balakrishnan S., Ratinder J., Shah Newaz Ahmed. A comparative experimental study of analgesic activity of a novel non-steroidal anti-inflammatory molecule – zaltoprofen, and a standard drug – piroxicam, using murine models. *Journal of Experimental Pharmacology.* 2019; 11: 85–91.

**Сведения об авторах:**

**Кузнецова Лада Владимировна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

**Клишина Наталья Юрьевна**, науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

**Карпова Маргарита Николаевна**, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

**Кукушкин Михаил Львович**, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2024  
УДК 616-092.11

Семендяев А.А.<sup>1</sup>, Даренская М.А.<sup>2</sup>, Ступин Д.А.<sup>1,2</sup>, Колесников С.И.<sup>2</sup>,  
Семенова Н.В.<sup>2</sup>, Тухиева Д.В.<sup>1</sup>, Колесникова Л.И.<sup>2</sup>

## Оценка факторов ангиогенеза сыворотки крови у пациенток с первичным варикозом вен малого таза

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
664003, Иркутск, Россия, ул. Красного Восстания, д. 3;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Министерства образования и науки России,  
664003, Иркутск, Россия, ул. Тимирязева, д. 16

Несмотря на проводимые исследования в области патогенеза варикозной болезни вен малого таза (ВБВМТ), вопрос ангиогенеза (АГ) при ВБВМТ освещен недостаточно. Системный подход к венозным дилатационным заболеваниям, в том числе с точки зрения АГ, расширит понимание патофизиологических механизмов ВБВМТ и побудит к поиску новых методов его коррекции. **Цель исследования** – оценка показателей ангиогенеза у женщин с различной степенью тяжести варикоза вен малого таза.

**Методика.** Обследованы 183 пациентки с ВБВМТ, разделенные в соответствии с тяжестью заболевания на 3 группы: 1-я группа (легкая степень тяжести варикозного процесса,  $n=79$ ); 2-я группа (среднетяжелая степень,  $n=63$ ); 3-я группа (тяжелая степень,  $n=41$ ). В качестве контроля использовались данные 30 практически здоровых женщин. Определение содержания в плазме периферической крови про- и антиангиогенных факторов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**Результаты** исследования показали наличие статистически значимых различий у пациенток с 1 стадией ВБВМТ в отношении более высоких значений содержания ангиогенина, PAI-1, сниженного уровня PDGF и TIMP-1 относительно контроля. Пациентки 2 стадии имели более высокие концентрации ангиогенина, MMP-8, MMP-9, PAI-1, сниженные уровни PDGF и TIMP-1 по сравнению с контрольными значениями. Третья стадия заболевания отличалась повышенными значениями содержания ангиогенина, MMP-8, MMP-9, FGF, PAI-1, сниженными уровнями PDGF и TIMP-1 по отношению с контрольным данным.

**Заключение.** Данные результаты могут способствовать более точной оценке интенсивности и динамики прогрессирования варикозного изменения вен малого таза у женщин с целью оптимизации диагностики и разработки методов коррекции.

**Ключевые слова:** варикоз вен малого таза; женщины; ангиогенез; ингибиторы ангиогенеза; матриксные металлопротеиназы; сыворотка крови

**Для цитирования:** Семендяев А.А., Даренская М.А., Ступин Д.А., Колесников С.И., Семенова Н.В., Тухиева Д.В., Колесникова Л.И. Оценка факторов ангиогенеза сыворотки крови у пациенток с первичным варикозом вен малого таза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(2): 20-27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.20-27

**Участие авторов:** сбор и обработка материала – Семендяев А.А., Ступин Д.А., Тухиева Д.В.; концепция и дизайн исследования – Семендяев А.А., Ступин Д.А.; статистическая обработка – Ступин Д.А., Семенова Н.В.; написание текста – Даренская М.А., Семендяев А.А., Ступин Д.А.; редактирование – Даренская М.А., Колесников С.И., Колесникова Л.И. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Для корреспонденции:** Даренская Марина Александровна, e-mail: marina\_darenskaya@inbox.ru

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

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

Поступила 11.03.2024  
Принята к печати 25.04.2024  
Опубликована 14.06.2024

Semendyaev A.A.<sup>1</sup>, Darenskaya M.A.<sup>2</sup>, Stupin D.A.<sup>1,2</sup>, Kolesnikov S.I.<sup>2</sup>, Semenova N.V.<sup>2</sup>, Tukhieva D.V.<sup>1</sup>, Kolesnikova L.I.<sup>2</sup>

## Evaluation of serum angiogenesis factors in patients with pelvic venous incompetence

<sup>1</sup> Irkutsk State Medical University,

3 Krasnogo vosstaniya str., Irkutsk, 664003, Russian Federation;

<sup>2</sup> Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems,

16 Timiryazeva str., Irkutsk, 664003, Russian Federation

Despite extensive studies, the role of angiogenesis (AG) in pelvic venous incompetence (PVI) is not sufficiently understood. A systematic approach to dilating venous diseases, including consideration AG, will expand understanding of the pathophysiological mechanisms of PVI and encourage the search for new methods for its correction. Thus, this study **aimed** to evaluate parameters of angiogenesis in women with varying degrees of PVI.

**Methods.** We examined 183 patients with PVI, divided according to the severity of the disease into three groups: Stage 1 (mild PVI,  $n=79$ ); Stage 2 (moderate PVI,  $n=63$ ); Stage 3 (severe PVI,  $n=41$ ). Control data were collected from 30 apparently healthy women. The contents of pro- and anti-angiogenic factors in peripheral blood plasma were determined by enzyme-linked, immunosorbent assay.

**The results** showed higher angiogenin and PAI-1 and lower PDGF and TIMP-1 in Stage 1 PVI compared to control values. Stage 2 patients had higher angiogenin, MMP-8, MMP-9, and PAI-1 and lower PDGF and TIMP-1 compared to control values. Stage 3 patients had higher angiogenin, MMP-8, MMP-9, FGF, PAI-1, and lower PDGF and TIMP-1 compared to control values.

**Conclusion.** These findings provide a more accurate assessment of the intensity and dynamics of progressive PVI in women, which may lead to improved diagnosis and development of correctional therapy for PVI.

**Keywords:** pelvic venous incompetence; women; angiogenesis; angiogenesis inhibitors; matrix metalloproteinases; blood serum.

**For citation:** Semendyaev A.A., Darenskaya M.A., Stupin D.A., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Tukhieva D.V., Kolesnikova L.I. Evaluation of serum angiogenesis factors in patients with pelvic venous incompetence. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 20–27. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.20-27

**For correspondence:** Marina A. Darenskaya, Doctor of Biological Sciences, prof., chief researcher of the Laboratory of Pathophysiology of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: marina\_darenskaya@inbox.ru

**Contribution:** collection and processing of material – Semendyaev A.A., Stupin D.A., Tukhieva D.V.; study concept and design – Semendyaev A.A., Stupin D.A.; statistics – Stupin D.A., Semenova N.V.; writing the text – Darenskaya M.A., Semendyaev A.A., Stupin D.A.; editing the text – Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I. All co-authors — approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

### Information about the authors:

Semendyaev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4107-6285>

Darenskaia M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3255-2013>

Stupin D.A., <https://orcid.org/0000-0002-0687-4804>

Kolesnikov S.I., <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

Semenova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6512-1335>

Kolesnikova L.I., <https://orcid.org/0000-0003-3354-2992>

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

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

Received 11.03.2024

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

## Введение

Проблема варикозной болезни вен малого таза (ВБВМТ) у женщин заслуживает особого внимания в связи с наличием хронических тазовых болей, высокой частотой репродуктивных расстройств и, зачастую, рецидивирующим характером течения [1]. Для ВБВМТ характерными являются увеличение длины вен малого таза, специфические морфологические изменения (извилистость, мешковидные расширения, изменения просвета клапанов) [2]. Варикозная деформация спо-

собствует снижению скорости венозного кровотока, рефлюксам крови, гиперволемии, флебогипертензии, росту венозного сопротивления и развитию венозной недостаточности [3]. Отмечают, что данные патофизиологические характеристики являются вторичными по отношению к процессам, происходящим непосредственно в венозной стенке [4]. На сегодняшний момент, по мнению ряда исследователей, преобладающими факторами развития венозных нарушений яв-

ляются гипоксия и ишемия тканей, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс, эндотелиальная дисфункция, а также повреждение компонентов сосудистой стенки [5-7].

Важным стимулом, способствующим росту рефлюксогенных зон при ВРВМТ, и, соответственно, выраженности венозной недостаточности, является образование новых сосудов, так называемый процесс ангиогенеза (АГ) [8]. АГ характеризуется образованием в органе или ткани новых кровеносных сосудов (из ранее существующих) путем миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, с формированием новых микрокапилляров от сосудов-предшественников, считается физиологическим процессом, который практически не происходит в здоровом организме [9, 10].

Значительный прогресс в изучении АГ был достигнут в результате выявления решающей роли эндотелия, а именно, возможности идентификации биомаркеров-стимуляторов и ингибиторов данного процесса [11]. Однако, несмотря на полученные данные, до сих пор не удается эффективно управлять АГ [12, 13].

Вопрос АГ при ВБВМТ также недостаточно освещен. Так, есть сведения о стимулировании АГ при ВБВМТ в результате снижения парциального давления кислорода при гипоксии и ишемии тазовых органов, и сопутствующих нарушений в системе антиоксидантной защиты [14]. Среди важных патогенетических звеньев также выделяют эндотелиальную дисфункцию, обусловленную действием атерогенных факторов и хроническую эндотоксическую агрессию вследствие развития воспаления [15].

Получение новых сведений относительно факторов АГ при ВБВМТ позволит уточнить недостающие знания о патогенезе данного процесса и, соответственно, улучшить оценку стадий прогрессирования варикоза вен малого таза у женщин, и оптимизировать способы коррекции данной патологии.

На основании вышеизложенного, **цель** исследования – оценка показателей факторов ангиогенеза у женщин с различной степенью тяжести варикоза вен малого таза.

### Методика

Обследованы 183 пациентки с ВБВМТ, разделенные в соответствии с тяжестью заболевания на 3 группы: 1-я группа (легкая степень тяжести варикозного процесса,  $n=79$ ); 2-я группа (среднетяжелая степень,  $n=63$ ); 3-я группа (тяжелая степень,  $n=41$ ). Диагноз ВБВМТ верифицирован на этапе клинико-инструментального обследования и окончательно подтвержден гистологически [5]. В ходе обследования проведено

ультразвуковое ангиосканирование тазовых вен и лечебно-диагностическая лапароскопия. Все три группы с ВБВМТ были сопоставимы по основным жалобам, возрасту, гинекологической и экстрагенитальной патологии. Контрольную группу составили 30 практически здоровых женщин, которым была выполнена хирургическая стерилизация лапароскопическим доступом на основе добровольного согласия.

Получение информированного согласия на участие в исследовании было обязательной процедурой при включении женщин в одну из групп. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Выписка из протокола заседания № 3.1 от 26.10.2012).

Критерии включения (ВБВМТ и контрольная группа): женский пол, репродуктивный возраст (20–45 лет), информированное согласие на участие в исследовании. Критерии включения (ВБВМТ): подтвержденный диагноз – первичной ВБВМТ по результатам ультразвукового исследования с дуплексным ангиосканированием. Критерии исключения (ВБВМТ): наличие сопутствующей соматической патологии, гинекологических заболеваний и органических поражений в малом тазу. Критерии включения (контрольная группа): отсутствие на момент обследования острого заболевания или обострения хронических заболеваний, отсутствие патологии венозной системы. Критерии исключения (ВБВМТ и контрольная группа): беременность, прием, в течение последних 6 мес препаратов венотонизирующего, ангиопротективного, антиоксидантного действия или синтетических аналогов женских половых гормонов (гормональные контрацептивы).

Стадийность варикозной трансформации вен при первичном ВРВМТ была установлена на основании результатов дуплексного ангиосканирования [16]. Исследование проводили на аппарате Voluson GE10 Healthcare (Австрия), с использованием конвексного датчика 4–8 МГц и вагинального датчика 7 МГц.

Определение содержания в плазме периферической крови факторов АГ: ангиогенина, матриксной металлопротеиназы-8 (matrix metalloproteinase, MMP-8), MMP-9, ингибитора активатора плазминогена (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (tissue metalloproteinase inhibitor, TIMP-1), тромбоцитарного фактора роста-4 (platelet-derived growth factor, PDGF-4), фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), тромбоспондина-1 (TSP-1) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием вышеуказанных тест-систем. Учет результатов производили на планшетном спектрофотометре Infinite F50 (TECAN).

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, Иркутск.

Статистический анализ результатов проводился с использованием программы Statistica 10.0 (Statsoft Inc., Р США). Для определения близости к нормальному закону-распределения количественных признаков использовали визуально-графический метод и критерии согласия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. Проверка равенства генеральных дисперсий осуществля-

лась с помощью критерия Фишера (F-test). Результаты исследования представлены в виде медианы (Me), первой и третьей квартилей (Q1; Q3). Сравнение межгрупповых различий выполнено с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. За уровень статистической значимости уровень принимали  $p < 0,05$ .

### Результаты

Результаты анализа профиля факторов ангиогенеза у пациенток с ВБВМТ в зависимости от степени тяжести варикозного процесса представлены в **таблице**.

#### Уровень факторов ангиогенеза в сыворотке крови у пациенток с различной степенью тяжести ВБВМТ (Me (Q1; Q3))

#### The level of angiogenesis factors in serum in patients with varying degrees of severity of PVI (Me (Q1; Q3))

Параметры	Степень тяжести ВБВМТ				P
	Группа контроля (n=30) (1)	1 группа (n=79) (2)	2 группа (n=63) (3)	3 группа (n=41) (4)	
Ангиогенин, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	363 (359;378)	665 (643;670)	760 (759;770)	813 (806;824)	$p_{1-2}$ $p_{1-3}$ $p_{1-4}$ $p_{2-4}$ $p_{3-4}$
ММР-8, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	171 (162;181)	204 (185;211)	374 (343;396)	419 (396;425)	$p_{1-3}$ $p_{1-4}$ $p_{2-3}$ $p_{2-4}$
ММР-9, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	197 (186;208)	245 (239;263)	386 (365;406)	501 (487;527)	$p_{1-3}$ $p_{1-4}$ $p_{2-3}$ $p_{2-4}$ $p_{3-4}$
FGF, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	115 (93;135)	978 (835;1016)	751 (675;720)	561 (520;617)	$p_{1-4}$
PDGF, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	562 (554;579)	452 (443;462)	332 (313;347)	271 (265;285)	$p_{1-2}$ $p_{1-3}$ $p_{1-4}$ $p_{2-3}$ $p_{2-4}$
РАI-1, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	503 (487; 519)	636 (618;657)	654 (635; 687)	682 (668;705)	$p_{1-2}$ $p_{1-3}$ $p_{1-4}$
ТИМР-1, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	568 (544;579)	306 (285;316)	207 (184;223)	146 (128;167)	$p_{1-2}$ $p_{1-3}$ $p_{1-4}$ $p_{2-3}$ $p_{2-4}$ $p_{3-4}$
TSP-1, у.е. / мкг мембранного белка / уровень кровотока	983 (871;1172)	1081 (1017;1139)	1163 (1081;1228)	961 (902; 1133)	

**Примечание.**  $p$  – статистически значимые различия между группами.

**Note.**  $p$  – statistically significant differences between groups.



Результаты исследования выявили статистически значимые различия у пациенток 1-й группы относительно контроля: более высокие значения содержания ангиогенина ( $p=0,001$ ), PAI-1 ( $p=0,041$ ), сниженный уровень PDGF ( $p=0,049$ ) и TIMP-1 ( $p=0,032$ ). Пациентки 2-й группы имели более высокие концентрации ангиогенина ( $p<0,0001$ ), MMP-8 ( $p=0,026$ ), MMP-9 ( $p=0,030$ ), PAI-1 ( $p=0,027$ ), сниженные уровни PDGF ( $p=0,027$ ) и TIMP-1 ( $p<0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой. Третья группа с ВРВМТ отличалась повышенным содержанием ангиогенина ( $p<0,0001$ ), MMP-8 ( $p<0,0001$ ), MMP-9 ( $p<0,0001$ ), FGF ( $p=0,038$ ), PAI-1 ( $p=0,010$ ), сниженными уровнями PDGF ( $p<0,0001$ ) и TIMP-1 ( $p<0,0001$ ) по отношению с контрольным данным. В отношении TSP-1 значимых различий между группами выявлено не было ( $p>0,05$ ) (таблица).

Межгрупповые изменения у больных ВРВМТ касались более высоких значений содержания ангиогенина ( $p<0,0001$ ), MMP-8 ( $p=0,017$ ), MMP-9 ( $p=0,042$ ), сниженных уровней PDGF ( $p=0,010$ ) и TIMP-1 ( $p=0,038$ ) у женщин 2-й группы относительно первой. Третья группа пациенток отличалась повышенными уровнями ангиогенина ( $p=0,010$ ), MMP-8 ( $p=0,017$ ), MMP-9 ( $p<0,0001$ ), сниженными значениями PDGF ( $p=0,001$ ) и TIMP-1 ( $p=0,010$ ) относительно первой группы; повышенными значениями содержания ангиогенина ( $p=0,030$ ), MMP-9 ( $p=0,016$ ), сниженными значениями TIMP-1 ( $p=0,041$ ) относительно второй группы (табл.).

### Обсуждение

Представления об эндотелийзависимых процессах, определяющих АГ сосудов и варикозные деформации, как итоговом эффекте изменений венозной стенки, дают основания исследовать варикоз вен малого таза с точки зрения дисбаланса про- и антиангиогенных факторов. В нашем исследовании показан рост фактора, активирующего АГ (ангиогенин), снижение активатора АГ (PDGF) и снижение значений ингибиторов АГ (TIMP-1, PAI-1) у пациенток с 1 стадией ВРВМТ.

Утверждается, что существует предел роста тканей без образования новой сосудистой сети, в условиях же ее увеличения свыше 1 кубического миллиметра новые сосуды являются необходимыми для адекватного снабжения кислородом и питательными веществами [8]. В данных условиях является обязательной выработка проангиогенных факторов роста, которая, в свою очередь, зависит от результирующего молекулярного баланса между активаторами и ингибиторами АГ [17]. Проангиогенная передача сигналов усиливается вследствие патофизиологических стимулов, в том

числе фактора гипоксии, которая является результатом увеличения массы тканей, дисфункции и окклюзии сосудов [8]. Процесс новообразования сосудов, в условиях стимулирования его индуктором АГ, в своем развитии проходит несколько этапов: повышение эндотелиальной проницаемости, разрушение базальной мембраны, миграция и пролиферация клеток эндотелия, их «созревание», с последующим формированием капиллярных трубок с новой базальной мембраной [18]. Действие индукторов АГ приводит к активации эндотелия и формированию точек роста, кроме того, отмечается растворение базальной мембраны сосудистого ствола вследствие действия металлопротеиназ, активаторов плазминогена и коллагеназ IV типа [19]. Миграция эндотелиальных клеток происходит в направлении к ангиогенному стимулу, в результате чего формируется тень с высокой пролиферативной активностью, и, в последующем уже – самостоятельные капиллярные трубки [11]. Дальнейшие события, обуславливающие формирование органических сосудистых сетей, в том числе, ремоделирование, дифференцировка, специализация клеточных популяций, происходят под контролем регуляторных факторов АГ – активаторов и ингибиторов [10].

К активаторам АГ относят факторы роста эндотелия сосудов, FGF, ангиогенин, а также неспецифические факторы, такие как матриксные металлопротеиназы (MMP) [18]. TSP-1, PF-4, ингибиторы MMP (TIMP-1), Serpin F1 причисляют, в свою очередь, к ингибиторам АГ. Важна скоординированность действия факторов АГ, при этом, в нормальных условиях ингибиторы АГ преобладают над активаторами.

Ангиогенин является членом семейства рибонуклеаз, многофункциональным белком, мощным индуктором синтеза новых кровеносных сосудов, играет важную роль в ряде физиологических и патологических процессов, в том числе онкогенного характера [19]. Для стимулирования АГ, секретируемый ангиогенин должен связаться с актином поверхности мембраны эндотелиальных клеток сосудов для активации каскада MMP, тем самым разрушая базальную мембрану и внеклеточный матрикс и позволяя эндотелиальным клеткам мигрировать [20]. Далее имеет место пролиферация эндотелия, образование новых сосудов, что также стимулируется ангиогенином. PDGF известен как основной фактор ремоделирования сосудов, вносит значительный вклад в неоваскуляризацию тканей [10, 20].

Вероятно, на начальной стадии заболевания включаются компенсаторные механизмы, препятствующие его прогрессированию. У пациенток с 1-й стадии

ей ВРВМТ, также было отмечено снижение уровней ряда ингибиторов АГ (РАI-1, ТIМР-1) относительно контрольных значений. РАI-1 является ингибитором сериновой протеазы, кодируемый человеческим геном SERPINE1 [21]. Присутствуя в повышенных количествах в фиброзных тканях, РАI-1 предотвращает протеолитическую активность и способствует снижению деградации коллагена и фиброгенеза тканей [8, 21]. ТIМР-1, известный своей функцией ингибирования металлопротеиназ, на самом деле осуществляет широкий спектр клеточных эффектов [22]. Совсем недавно были обнаружены его свойства как цитокина, действующего через различные рецепторы клеточной поверхности, а повышенные уровни ТIМР-1 в крови коррелировали с прогрессированием воспалительных реакций [23]. Вследствие чего, снижение данного фактора на первой стадии ВРВМТ можно считать благоприятным признаком.

Вторая стадия заболевания отличалась помимо изменений, характерных для первой стадии, также ростом значений MMP-8 и MMP-9. MMP относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, которые классифицируют на основе их субстратов и организации структурных доменов на коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, мембранного типа и другие [24]. MMP вызывают деградацию различных белков во внеклеточном матриксе, в частности, таких, как коллаген и эластин, что будет способствовать его разрушению и, таким образом, влиять и на функцию эндотелиальных клеток [25]. Увеличение количества специфических MMP может играть роль в ремоделировании артерий, формировании аневризм, расширении вен и венозных деформациях [8]. MMP участвуют также в инфильтрации лейкоцитов и воспалении тканей [9]. MMP регулируются эндогенными тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМР), а соотношение MMP/ТИМР часто определяет степень деградации белков межклеточного матрикса [26]. Не исключено, что в условиях прогрессирования тканевой гипоксии органов таза, избыточная секреция MMP-8 и MMP-9 на 2-й стадии патологического процесса будет приводить к избыточности формирования «новых» кровеносных сосудов, опосредованно влияя на развитие маточной и яичниковой функциональной недостаточности.

Тяжелое течение заболевания (3 стадия ВРВМТ) отличалось более выраженными изменениями всех вышеуказанных показателей, как относительно контрольного уровня, так и относительно предыдущих стадий заболевания. Дополнительным фактором, патологического процесса на данной стадии ВРВМТ являлся рост значений FGF. Известно, что совокупность несколь-

ких ангиогенных стимуляторов, в том числе – сосудистых эндотелиальных факторов роста, PDGF и FGF вносят значительный вклад в неоваскуляризацию тканей, а также ремоделирование сосудов [27]. FGF напрямую действует на эндотелиальные клетки через рецепторы FGF, стимулируя пролиферацию и проявляя мощный ангиогенный эффект [28].

Основным индуктором АГ при ВРВМТ является гипоксия, которая способствует митохондриальной дисфункции и тесно связана с реакциями окислительного стресса [2, 6]. Отмечается рост активных форм кислорода (АФК) и продуктов липопероксидации, снижение уровня антиоксидантных факторов и ферментов детоксикации [5, 7, 11]. Недостаток кислорода главным образом сказывается на накоплении факторов, стимулированных гипоксией, например, HIF-1 $\alpha$ , что, в свою очередь, индуцирует экспрессию ангиогенных стимуляторов [29]. Повышение HIF-1 $\alpha$  приводит к увеличению РАI-1, развивается фиброз, ремоделирование внеклеточного матрикса, последующая нестабильность и дисфункция интимы [4]. АФК, в свою очередь, также стимулируют повышение HIF-1 $\alpha$ , ведут к активации и трансактивации рецепторов эндотелиальных факторов роста. Эндотелиальные факторы роста сосудов и повышение проницаемости сосудов посредством оксида азота запускают процессы васкуло- и ангиогенеза [11]. Имеются также данные об эстрогеновой гиперстимуляции АГ у женщин с ВРВМТ, вследствие высокой концентрации гормонов яичников в тазовых венах [30].

Таким образом, варикозное ремоделирование вен у женщин с ВРВМТ происходит в результате сложного взаимодействия различных факторов, включая дисбаланс активаторов и ингибиторов АГ, способствующих деструкции внеклеточного матрикса. Чрезмерная деградация последнего, в сочетании с нарушением клеточной функции может усилить венозную деформацию и способствовать дальнейшему прогрессированию заболевания. Системный подход к венозным дилатационным заболеваниям, в том числе с точки зрения АГ, расширит понимание патофизиологических механизмов ВРВМТ и побудит к поиску новых методов его коррекции.

### Заключение

Можно заключить, что развитие варикозного расширения вен малого таза у женщин связано с комплексом патофизиологических явлений, ассоциирующихся с высокой интенсивностью процессов ангиогенеза по мере нарастания степени тяжести патологического процесса. При легкой степени тяжести изменения

являются первичными и характеризуются компенсаторными механизмами в виде увеличения показателя PAI-1. С увеличением степени тяжести ВРВМТ отмечаются более выраженные нарушения, проявляющиеся выраженной активностью ферментов-стимуляторов АГ во вторую и ростом фактора роста фибробластов – в третью стадию ВРВМТ. Данные результаты могут способствовать более точной оценке интенсивности и динамики прогрессирования варикозного изменения вен малого таза у женщин с целью оптимизации диагностики и разработки методов их коррекции.

### Литература

(п.п. 1; 2; 4; 6; 8; 11; 12; 14; 19-30 см. References)

3. Цуканов Ю.Т., Цуканов А.Ю., Притыкина Т.В., Щеглов В.Г., Мозговой С.И. Биохимические, иммунологические и патоморфологические особенности варикозной болезни вен у больных недифференцированной дисплазией соединительной ткани. *Казанский медицинский журнал*. 2007; 88(5): 132-7.
5. Колесникова Л.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Даренская М.А., Гребёнкина Л.А., Натяганова Л.В. и др. Интенсивность процессов липопероксидации у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2018; 73(4): 229-35. <https://doi.org/10.15690/vramn1005>
7. Даренская М.А., Ступин Д.А., Семендяев А.А., Колесников С.И., Гребенкина Л.А., Щербатых А.В. и др. Сравнительный анализ липопероксидации в периферическом и регионарном кровотоках у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(7): 374-80. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-374-380>
9. Черток В.М., Черток А.Г., Зенкина В.Г. Эндотелиозависимая регуляция ангиогенеза. *Цитология*. 2017; 59(4): 243-58.
10. Батырова А.С., Баканов М.И., Сурков А.Н. Состояние системы ремоделирования сосудов и ангиогенеза печени при хронических формах ее патологии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(1): 73-8.
13. Клабуков И.Д., Балясин М.В., Люндуп А.В., Крашенинников М.Е., Титов А.С., Мудряк Д.Л. и др. Ангиогенная витализация биосовместимого и биодеградируемого матрикса (экспериментальное исследование *in vivo*). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 53-60. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.02.53-60>
15. Даренская М.А., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Колесников С.И., Семенова Н.В., Пестерев К.В. и др. Показатели клеточного и гуморального иммунитета в периферическом и локальном кровотоках у пациенток с первичным варикозом вен малого таза. *Инфекция и иммунитет*. 2023; 13(2): 355-62. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-САН-2108>
16. Семендяев А.А., Ступин Д.А., Черепанова М.А., Бачурина В.М., Селецкий А.Н., Колесникова Л.И. *Патент на изобретение № 2646563. Способ определения функционального состояния венозной системы малого таза у женщин*. Дата гос. регистрации в Государственном реестре изобретений РФ 05 марта 2018 г.
17. Кирова Ю.И., Германова Э.Л. Новые аспекты энерготропного действия мексидола. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 36-40. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.36-40>
18. Кондратович Л.М. Современный взгляд на этиологию, патогенез и способы лечения миомы матки. *Российский медицинский журнал*. 2014; (5): 36-40.

### References

1. Matei S.C., Dumitru C.Ş., Opriţoiu A.I., Marian L., Murariu M.S., Olariu S. Female gonadal venous insufficiency in a clinical presentation which suggested an acute abdomen – a case report and literature review. *Medicina*. 2023; (59): 884. <https://doi.org/10.3390/medicina59050884>
2. Barge T.F., Uberoi R. Symptomatic pelvic venous insufficiency: a review of the current controversies in pathophysiology, diagnosis, and management. *Clinical radiology*. 2022; 77(6): 409-17. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2022.01.053>
3. Tsukanov Yu.T., Tsukanov A.Yu., Pritykina T.V., Shcheglov V.G., Mozgovoy S.I. Biochemical, immunological and pathomorphological features of varicose veins in patients with undifferentiated connective tissue dysplasia. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2007; 88(5): 132-7. (In Russian)
4. Bałabuszek K., Toborek M., Pietura R. Comprehensive overview of the venous disorder known as pelvic congestion syndrome. *Annals of Medicine*. 2022; 54(1): 22-36. <https://doi.org/10.1080/07853890.2021.2014556>
5. Kolesnikova L.I., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Natyaganova L.V., et al. The intensity of lipid peroxidation processes in women with primary varicose veins of the small pelvis, depending on the stage of the disease. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2018; 73(4): 229-35. (In Russian). <https://doi.org/10.15690/vramn1005>
6. Yetkin E., Ileri M. Dilating venous disease: pathophysiology and a systematic aspect to different vascular territories. *Medical Hypotheses*. 2016; (91): 73-6. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.04.016>
7. Darenskaya M.A., Stupin D.A., Semendyaev A.A., Kolesnikov S.I., Grebenkina L.A., Shcherbatykh A.V., et al. Comparative analysis of lipid peroxidation in peripheral and regional blood flow in women with primary pelvic varicose veins. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2022; 67(7): 374-80. (In Russian). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-374-380>
8. Dudley A.C., Griffioen A.W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*. 2023; (26): 313-47. <https://doi.org/10.1007/s10456-023-09876-7>
9. Chertok V.M., Chertok A.G., Zenkina V.G. Endothelial-dependent regulation of angiogenesis. *Tsitologiya*. 2017; 59(4): 243-58. (In Russian)
10. Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N. The state of the system of vascular remodeling and liver angiogenesis in chronic forms of its pathology. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(1): 73-8. (In Russian)
11. Don E.E., Middelkoop M.A., Hehenkamp W.J., Mijatovic V., Griffioen A.W., Huirne J.A. Endometrial angiogenesis of abnormal uterine bleeding and infertility in patients with uterine fibroids – a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(8): 7011. <https://doi.org/10.3390/ijms24087011>
12. Cao Y., Langer R., Ferrara N. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023; 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00671-z>

13. Klabukov I.D., Balyasin M.V., Lyundup A.V., Krashennikov M.E., Titov A.S., Mudryak D.L., et al. Angiogenic vitalization of a biocompatible and biodegradable matrix (in vivo experimental study). *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(2): 53-60. (In Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.02.53-60>
14. Darenskaya M.A., Stupin D.A., Semendyaev A.A., Kolesnikov S.I., Shcherbatykh A.V., Tolkachev K.S., et al. Pelvic venous insufficiency: lipid peroxidation levels in ovarian venous blood. *Biomedical Research and Therapy*. 2022; 9(2): 4884-91. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v9i2.730>
15. Darenskaya M.A., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Pesterev K.V., et al. Indicators of cellular and humoral immunity in peripheral and local bloodstreams in patients with primary varicose veins of the small pelvis. *Infektsiya i immunitet*. 2023; 13(2): 355-62. (In Russian) <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CAH-2108>
16. Semendyaev A.A., Stupin D.A., Cherepanova M.A., Bachurina V.M., Seletskiy A.N., Kolesnikova L.I. *A method for determining the functional state of the venous system of the pelvis in women*. Patent 2646563, RF; 2018. (In Russian)
17. Kirova Yu.I., Germanova E.L. New aspects of the energy-tropic action of Mexidol. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(4): 36-40. (In Russian) <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.36-40>
18. Kondratovich L.M. A modern view on the etiology, pathogenesis and treatment of uterine fibroids. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; (5): 36-40. (In Russian)
19. Yu D., Cai Y., Zhou W., Sheng J., Xu Z. The potential of angiogenin as a serum biomarker for diseases: systematic review and meta-analysis. *Disease markers*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1984718>
20. Pamuk A.E., Gedik M.E., Sutay Suslu N., Gunaydin G. Candidate angiogenesis related biomarkers in patients with laryngeal carcinoma (AngLaC): A prospective cohort study. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2023; 168(6): 1433-442. <https://doi.org/10.1002/ohn.219>
21. Alotaibi F.T., Peng B., Klausen C., Lee A.F., Abdelkareem A.O., Orr N.L., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in endometriosis. *PLoS One*. 2019; 14(7): e0219064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219064>
22. Schoeps B., Frädrieh J., Krüger A. Cut loose TIMP-1: An emerging cytokine in inflammation. *Trends in cell biology*. 2023; 33(5): 413-26. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.08.005>
23. Grünwald B., Schoeps B., Krüger A. Recognizing the molecular multifunctionality and interactome of TIMP-1. *Trends in cell biology*. 2019; 29(1): 6-19. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.08.006>
24. Cui N., Hu M., Khalil R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in molecular biology and translational science*. 2017; (147): 1-73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
25. Kwon M.J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. *Frontiers in Oncology*. 2023; (12): 1108695. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1108695>
26. Demirtaş H., Doğan A. *Pelvic congestion syndrome*. International Academic Research and Reviews in Health Sciences. ANKARA; 2023.
27. Hosaka K., Yang Y., Seki T., Du Q., Jing X., He X., et al. Therapeutic paradigm of dual targeting VEGF and PDGF for effectively treating FGF-2 off-target tumors. *Nat Commun*. 2020; (11): 3704. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17525-6>
28. Yu P., Wilhelm K., Dubrac A., Tung J.K., Alves T.C., Fang J.S., et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature*. 2017; (545): 224-8. <https://doi.org/10.1038/nature22322>
29. Darenskaya M.A., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Pesterev K.V., et al. Pro- and anti-inflammatory blood cytokines levels in women with moderate and severe pelvic venous insufficiency. *Journal of Biomedicine*. 13(1): 54-7. [https://dx.doi.org/10.21103/Article13\(1\)\\_OA51](https://dx.doi.org/10.21103/Article13(1)_OA51)
30. Ricci S. Varicose veins in women with Pelvic Congestion Syndrome: the hypothesis of the hormonal pathogenesis. *Journal of Theoretical and Applied Vascular Research*. 2018; 3(3). <https://doi.org/10.24019/jtav.88>

**Сведения об авторах:**

**Семендяев Андрей Александрович**, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детей и подростков ФГБОУ ВО ИГМУ, e-mail: aasemendiaev@mail.ru;

**Даренская Марина Александровна**, проф. РАН, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. патофизиологии ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, e-mail: marina\_darenskaya@inbox.ru;

**Ступин Дмитрий Андреевич**, канд. мед. наук, доцент, докторант ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, e-mail: stupindima@stupindima.ru;

**Колесников Сергей Иванович**, акад. РАН, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, засл. деят. науки РФ;

**Семенова Наталья Викторовна**, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. патофизиологии ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, e-mail: natkor\_84@mail.ru;

**Тухиева Дарья Владиславовна**, ассистент каф. акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детей и подростков ФГБОУ ВО ИГМУ;

**Колесникова Любовь Ильинична**, акад. РАН, доктор мед. наук, проф., науч. рук. ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, засл. деят. науки РФ.

© Коллектив авторов, 2024  
УДК 612.115.064

Успенская М.С.<sup>1</sup>, Ляпина Л.А.<sup>1</sup>, Сороколетов С.М.<sup>2</sup>, Мурашев В.В.<sup>1</sup>, Калугина М.Д.<sup>1</sup>

## Изучение антикоагулянтных эффектов экстрактов из корней пиона селекционного (Bartzella)

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,  
119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1/12;  
<sup>2</sup>ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗМ,  
125284, Москва, Россия, 2-й Боткинский пр., дом 5, корп. 22

**Введение.** Изучение веществ с антикоагулянтными свойствами актуально для физиологии и медицины в связи с широким распространением тромбоопасных состояний в организме человека и животных. Известны растения с подобными эффектами за счет наличия в их тканях молекул полисахаридных гепариноподобных компонентов, которые препятствуют развитию тромбозов.

**Цель исследования** – выявить антикоагулянтные и антиполимеризационные в отношении фибрина эффекты полученного нами экстракта из корней селекционного пиона Bartzella и описать возможные механизмы его действия на экспериментально вызванный тромбоз у крыс.

**Методика.** Исследовано влияние экстракта из селекционного пиона на антикоагулянтную активность плазмы крови крыс тремя тестами – АЧТВ (активированного частичного тромбопластинового времени), ПВ (протромбинового времени), ТВ (тромбинового времени), степень полимеризации фибрина и на процессы растворения фибрина в условиях тромбообразования *ex vivo*. Использовались лабораторные животные – крысы-самцы линии *Wistar*. Оценивали фибринолитическую активность плазмы крови крыс по тестам суммарной фибринолитической активности (СФА), неферментативного фибринолиза (НФ), ферментативного фибринолиза (ФФ) на нестабилизированных пластинах фибрина. Полимеризацию фибрина выявляли по тесту фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) плазмы крови на нестабилизированном фактором XIIIa фибрине.

**Результаты.** Установлено наличие антикоагулянтных (по удлинению АЧТВ, ТВ, ПВ) и фибринолитических (по усилению СФА, НФ) свойств плазмы после добавления экстракта из гибридного пиона к плазме крови здоровых крыс в соотношении 0.25:1. В условиях *ex vivo* при моделировании тромбоза у крыс введением животным тканевого тромбопластина (первая модель тромбоза – МТ) добавление к такой плазме крови экстракта из корней пиона Bartzella повышало СФА и НФ на 26 и 45% соответственно. Описаны механизмы активирующего действия экстракта на фибринолиз плазмы вследствие ингибирования тромбина и полимеризации фибрина. На второй МТ *ex vivo* (в пробирках к плазме крови крыс в объеме 0.2 мл приливали 2 NIH ед. тромбина – 0.05 мл, фибриновый сгусток образовывался в течение 2-3 мин) показано, что экстракт из пиона в объеме 0.1 мл 0.5%-й, добавленный к преобразованному сгустку спустя 15 мин после создания МТ, способен растворять фибрин.

**Заключение.** Установлено, что экстракт из корней селекционного пиона обладал антикоагулянтным и фибриндеполимеризационным эффектами, также при действии на преобразованный нестабилизированный фибрин вызывал растворение свежесформированных фибриновых сгустков. Описаны механизмы активирующего действия экстракта на фибринолиз плазмы вследствие ингибирования тромбина и полимеризации фибрина.

**Ключевые слова:** экстракт пиона; фибринолиз; тромбоз; антикоагулянт

**Для цитирования:** Успенская М.С., Ляпина Л.А., Сороколетов С.М., Мурашев В.В., Калугина М.Д. Изучение антикоагулянтных эффектов экстрактов из корней пиона селекционного (Bartzella). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(2): 28-33.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.28-33

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Успенская М.С.; написание текста – Ляпина Л.А., Сороколетов С.М.; редактирование – Мурашев В.В.; определение параметров крови – Ляпина Л.А., Калугина М.Д. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Успенская Марианна Сергеевна, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена по теме госбюджетного НИОКР.

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

Поступила 12.03.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

Uspenskaya M.S.<sup>1</sup>, Lyapina L.A.<sup>1</sup>, Sorokoletov S.M.<sup>2</sup>, Murashev V.V.<sup>1</sup>, Kalugina M.D.<sup>1</sup>

## Anticoagulant effects of root extracts from the breeding peony (Bartzella)

<sup>1</sup>Biology School, Lomonosov Moscow State University,  
1/12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russian Federation;

<sup>2</sup>Botkin Municipal Clinical Hospital,  
2<sup>nd</sup> Botkinsky Proezd, 5, Bldg. 22, Moscow, 123284, Russian Federation

**Introduction.** Studying substances with anticoagulant properties is relevant for physiology and medicine due to the widespread occurrence of thrombotic conditions in humans and animals. Plants with such effects are known for the presence of anti-thrombotic polysaccharide heparin-like components in their molecular structure.

**The aim** of the study was to identify the anticoagulant and antipolymerization effects on fibrin of the extract obtained from the roots of the breeding peony Bartzella and to describe possible mechanisms of its action on experimental ex vivo thrombosis in rats.

**Methods.** The effect of a breeding peony extract on the anticoagulant activity of rat blood plasma was studied using three tests, including activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and thrombin time (TT), on the degree of fibrin polymerization (DFP) and on the fibrin dissolution in ex vivo thrombosis. Wistar male rats were used for the experiments. The fibrinolytic activity of rat blood plasma was evaluated by tests of total fibrinolytic activity (TFA), non-enzymatic fibrinolysis (NEF), and enzymatic fibrinolysis (EF) on non-stabilized fibrin plates. Fibrin polymerization was detected with the test of fibrin-depolymerization activity (FDPA) of blood plasma on factor XIIIa-unstabilized fibrin.

**Results.** The study demonstrated the anticoagulant (by prolongation of APTT, TT, and PT) and fibrinolytic (by increases in TFA and NEF) properties of the plasma from healthy rats after the addition of the peony extract to plasma in a ratio of 0,25:1. In the ex vivo model of thrombosis in rats injected with tissue thromboplastin (first thrombosis model, TM), the addition of the peony root extract to such plasma increased TFA and NEF by 26% and 45%, respectively. The mechanism of the activating effect of the extract on plasma fibrinolysis was found to be due to the inhibition of thrombin and of the fibrin polymerization. In the second ex vivo TM (2 NIH units of thrombin in a volume of 0,05 ml were added to 0,2 ml of rat blood plasma; a fibrin clot formed within 2-3 minutes), it was shown that a 0,5% extract in a volume of 0,1 ml added to a pre-formed clot 15 minutes after modeling thrombosis, was capable of dissolving fibrin.

**Conclusion.** The breeding peony root extract had anticoagulant and fibrin-depolymerization effects. When acting on pre-formed non-stabilized fibrin the extract caused the dissolution of freshly formed fibrin clots. A possible mechanism of the effect of the breeding peony extract on the fibrin dissolution in a blood clot due to thrombin inhibition is discussed.

**Keywords:** peony extract; fibrinolysis; thrombosis; anticoagulant

**For citation:** Uspenskaya M.S., Lyapina L.A., Sorokoletov S.M., Murashev V.V., Kalugina M.D. Anticoagulant effects of root extracts from the breeding peony (Bartzella). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 28-33. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.28-33

**Author's contribution:** concept and design of the study – Uspenskaya M.S.; writing of the text – Lyapina L.A.; Sorokoletov S.M.; editing – Murashev V.V.; determination of blood parameters – Lyapina L.A., Kalugina M.D. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

**For correspondence:** *Uspenskaya Marianna S.*, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru

### Information about the authors:

Uspenskaya M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5368-4026>

Lyapina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Sorokoletov S.M., <https://orcid.org/0000-0002-2637-8167>

Murashev V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5945-4451>

**Financing.** The work was carried out on the topic of state-funded R&D.

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

Received 12.03.2024

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

## Введение

Известно, что многие растения служат источником лекарственного сырья, содержащего антикоагулянты и фибринолитики [1-3]. Противосвертывающее действие таких растений связано с наличием в их состав-

е фукоиданов [4], флавоноидов или полисахаридных гепариноподобных веществ [5-7]. К настоящему времени из девяти видов рода *Paonia* (единственный род из 33 известных видов семейства *Paoniaceae*, обитаю-

ший в Азии, Европе и Западной части Северной Америки) выделено более 180 соединений, включая терпены, фенолы, флавоноиды, эфирное масло и дубильные вещества. Терпены, наиболее распространенные природные соединения, на долю которых приходится около 57% и которые встречаются почти у всех видов пионов, ответственны за наблюдаемую биологическую активность *in vivo* и *in vitro* [8]. Ряд кустарниковых (древовидный) и травянистых (молочноцветковый, желтый и др.) пионов в своих корнях содержат гепариноподобные компоненты, которые подобны низкомолекулярным гепаринам (НМГ) животного или синтетического происхождения. НМГ обладают рядом преимуществ перед высокомолекулярными гепаринами (ВМГ), так как оказывают антикоагулянтные эффекты в организме при применении только 1 раз в сутки, не проявляют побочных отрицательных эффектов в виде кровоточивости и являются препаратами выбора для профилактики и лечения тромбозов [9]. Механизм антикоагулянтного действия гепариноподобных компонентов растений заключается в ингибировании фактора Ха, и тромбина [10, 11]. Показано, что экстракты из корней пиона Марьян корень проявляют не только антикоагулянтное, но и фибринолитическое действие как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, нормализуя параметры гемостаза [12], а также улучшая микроциркуляцию крови [13]. Отмечается, что растительные гепариноиды из пионов могут использоваться в качестве антикоагулянтов не только при внутривенном и внутримышечном введении в организм млекопитающих, но при безопасном пероральном их применении [9, 12]. Известно, что пион *Bartzella* является межсекционным гибридом между древовидным и травянистым пионами, экстракты из которых, как показано ранее [12, 13], оказывают противосвертывающие эффекты. Предполагается, что гибридный пион *Bartzella* будет проявлять высокое антикоагулянтное действие за счет синергетического эффекта от двух пионов, на основе которых создан гибрид.

**Цель** исследования — выявить антикоагулянтные и антиполимеризационные в отношении фибрина эффекты полученного нами экстракта из корней селекционного пиона *Bartzella* и описать возможные механизмы его действия на экспериментально вызванный тромбоз *ex vivo* у крыс.

### Методика

Для получения экстракта из корней пиона *Bartzella*, корни предварительно очищали, промывали водой, высушивали при 37°C, затем растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния и готовили 5%-ный экстракт на дистиллированной воде, к которому добав-

ляли этиловый спирт для осаждения балластных белков, после чего супернатант упаривали на лиофильной сушке. Из высушенного порошка готовили экстракт.

В исследованиях применялся экстракт из корней пиона селекционного, в котором было определено наличие гепариноподобного вещества фотоэлектроколориметрическим методом с использованием Азура А (красителя на кислые сульфо- и карбоксильные группы гепарина) и протаминсульфата (ингибитора гепарина) [14]. Гепариноид в количестве 0,5 мг, растворенный в 0,5 мл физиологического раствора, содержал 23-25 МЕ гепарина.

В экспериментах использовали 30 белых лабораторных крыс-самцов Wistar массой тела 200-230 г (возраст 6-8 мес). Животных выращивали в питомнике станции Столбовой Пушкинского района Московской области. До начала и в период проведения экспериментов крысы находились на обычном лабораторном рационе и содержались в стандартных условиях вивария биологического факультета МГУ со свободным доступом к воде и пище и соблюдением 12-часового светового режима дня. Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург 15.06.2006), Базельской и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Исследование было одобрено местным комитетом по этике биомедицинских исследований Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 97а от 30 октября 2019 года). Все используемые методы соответствовали требованиям Директивы ЕС 2010/63/ЕС (используется в научных целях с 1 января 2013 года) для экспериментов на животных.

Проведено две серии экспериментов: в первой серии использовалась кровь здоровых крыс, во второй — кровь животных в условиях экспериментального претромбоза. В первой серии при исследовании крови здоровых крыс к плазме добавляли экстракт из корней пиона, а также препарат сравнения — НМГ фирмы «Celsus» (США) в одинаковых концентрациях гепарина.

Состояние претромбоза у крыс осуществляли на разработанных нами моделях:

1) внутривенным введением 1% тканевого тромбопластина в объеме 0,6 мл/200 г массы тела через 30-40 мин после введения 2,5% раствора аминазина (0,06 мл/200 г массы тела) для выключения вегетативной нервной системы, использовали кровь животных через 30 мин после введения тромбопластина;

2) в пробирках к плазме крови крыс в объеме 0,2 мл приливали 2 НИЕ ед. тромбина — 0,05 мл, фибриновый

сгусток образовывался в течение 2-3 мин, через 15 мин после этого к преобразованному сгустку добавляли экстракт из пиона 0,5% в объеме 0,1 мл.

Кровь для исследования брали из яремной вены (*vena jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10-12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы крови.

Экстракт добавляли к плазме крови крыс в двух сериях в соотношении 0,25:1. Контролем служила плазма крови крыс, в которую вместо экстракта из корней пиона добавляли 0,85% NaCl.

Для характеристики параметров фибринолитического звена ПСС крови готовили пластины нестабилизированного фактором XIIIa фибрина, характеризующиеся наличием водородных связей в растворимом фибрин-полимере. В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: на нестабилизированном фибрине СФА – суммарную фибринолитическую активность, включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность пламина, НФ – неферментативный фибринолиз, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, отражающая процессы полимеризации фибрина; ФФ – ферментативный фибринолиз. Об антикоагулянтной активности плазмы судили по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), характеризующему внутренний механизм свертывания крови, тромбинового времени (ТВ), отражающему общий путь свертывания крови, протромбинового времени (ПВ), указывающему на внешний путь свертывания [15].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Подчинение данных закону нормального распределения проверяли по тесту Шапиро–Уилка. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов добавление экстракта из корней пиона к нормальной плазме крови крыс приводило к повышению антикоагулянтной активности, определяемой по тестам АЧТВ, ПВ и ТВ, на 121, 44 и 36% соответственно по сравнению с контрольными образцами, содержащими 0,85% раствор NaCl (принято за 100%). Одновременно наблюдалось усиление активностей разных видов фибринолиза.

Так, при этом в опытных пробах СФА повысилось на 26%, а НФ – на 45% сравнительно с контролем. Судя по повышению ФДПА, полимеризация фибрина при применении экстракта снижалась. Добавление к нормальной плазме крыс препарата сравнения – НМГ фирмы “Celsus” также приводило к удлинению АЧТВ и ТВ на 133 и 10% соответственно, в то время как СФА и НФ повышались на 16 и 25% соответственно. Эти данные свидетельствовали о практически одинаковом действии экстракта и НМГ на плазму крови здоровых крыс (см. табл.).

Во второй серии экспериментов получали кровь от животных с первой моделью тромбообразования (МТ), когда крысам предварительно вводили тромбопластин (контроль 2), при этом о претромбозе судили по достоверному снижению АЧТВ, ПВ, ТВ, СФА, НФ, ФФ на 29, 13, 21, 32, 26 и 34 % соответственно. Добавление к такой плазме крови (через 30 мин после введения тромбопластина) экстракта из корней гибридного пиона (соотношение 0,25:1) приводило к усилению антикоагулянтных свойств плазмы, что подтверждалось тестами АЧТВ, ПВ и ТВ, так как по сравнению с контролем наблюдалось соответствующее повышение на 42, 34 и 26%. При этом установлено увеличение СФА, ФФ и НФ на 20, 16 и 20% соответственно в отличие от контрольных проб, где не обнаружено ни антикоагулянтной активности, ни разных видов фибринолиза (см. табл.).

При второй МТ, когда добавление к преобразованному сгустку экстракта из пиона спустя 15 мин, способствовало растворению фибрина за счет проявления СФА, НФ и ФФ, которые повышались на 50, 50 и 26% соответственно (табл., вторая МТ).

На основании полученных данных можно предположить, что возможными механизмами активирующего действия экстракта на антикоагулянтную активность и фибринолиз плазмы обусловлен, во-первых, его ингибирующим действием на тромбин, что определено нами тестом ТВ, как это было продемонстрировано другими исследователями [16], а, во-вторых, блокирующим действием на процессы полимеризации фибрина (по определению ФДПФ), что согласуется с данными А.Ш. Бышевского и др. [17].

Антикоагулянты являются основными препаратами, используемыми для профилактики и лечения тромбоза. В настоящее время антикоагулянтные препараты в основном представляют собой многоцелевые гепариновые препараты, одноцелевые ингибиторы FXa и FIIa. Однако, антикоагулянтные препараты животного происхождения имеют побочный эффект – кровотечение. Изученный нами препарат из гибридного пиона не оказывал побочного геморрагического дей-



**Влияние экстракта из корней пиона селекционного на параметры гемостаза – АЧТВ, ТВ, ПВ, СФА, НФ, ФФ в нормальной плазме крови крыс (1 серия) и при моделировании тромбоза (2 серия) (M±m)**

**The effect of the extract from the roots of the breeding peony on the parameters of hemostasis – APTT, TT, PT, SFA, NF, FF in normal rat blood plasma (1 series) and in modeling thrombosis (2 series) (M±m)**

Исследуемые вещества	Параметры гемостаза					
	АЧТВ, с	ПВ, с	ТВ, с	СФА, мм <sup>2</sup>	НФ (ФДПА), мм <sup>2</sup>	ФФ, мм <sup>2</sup>
1-я серия экспериментов						
Опыт (экстракт)	81±5.8** (221%)	22.2±1.0** (144%)	17.0±0.8** (136%)	38±1.4** (126%)	24±2.0** (145%)	14±1.4 (103%)
Контроль 1 (0.85% NaCl)	36.6±0.9 (100%)	15.4±0.3 (100%)	12.5±1.0 (100%)	30±1.3 (100%)	16.5±1.1 (100%)	13.5±1.5 (100%)
НМГ “Celsus”- препарат сравнения	85.4±1.1** (233%)	–	13.8±0.7 (110%)	34.7±1.0* (116%)	20.7±0.7** (125%)	14±1.0 (103%)
2-я серия экспериментов (моделирование тромбоза)						
Опыт 1 (экстракт) (1 МТ)	37.2±1.3** (142%)	18.1±0.9** (134%)	10.1±1.0* (126%)	25.4±2.0* (120%)	14.7±0.8* (120%)	10.5±1.0 (116%)
Опыт 2 (экстракт) (2 МТ)	–	–	–	30.9±1.3** (150%)	18.4±0.7** (150%)	11.4±1.0* (126%)
Контроль 2 (0.85% NaCl претромбоз)	26.1±0.8 (71%)	13.5±1.3 (87%)	8.0±0.8 (79%)	20.5±1.1 (68%)	12.2±0.9 (74%)	9.0±0.7 (66%)

**Примечание.** Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля 1 и 2, принятых за 100%. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время, ТВ – тромбиновое время, СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ – неферментативный фибринолиз или (ФДПА) фибриндеполимеризационная активность, ФФ – ферментативный фибринолиз, 1 МТ – первая модель тромбообразования, 2 МТ – вторая модель тромбообразования. Контроль 1 – фоновые показатели плазмы крови здоровых крыс, контроль 2 – показатели плазмы крови на фоне введенного тромбопластина (после тромбообразования).

**Note.** Statistical indicators are calculated relative to the corresponding control samples 1 and 2, taken as 100%. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; APTT – activated partial thromboplastin time, PT – prothrombin time, TV – thrombin time, SFA – total fibrinolytic activity, NF – non-fermentative fibrinolysis or (FDPA) fibrindepolymerization activity, FF – fermentative fibrinolysis, 1 MT- the first model of thrombosis, 2 MT – the second model of thrombosis. Control 1 – background blood plasma values of healthy rats, control 2 – blood plasma values against the background of injected thromboplastin (after thrombosis).

ствия, так как представлял собой гепариноид низкой молекулярной массы, соответствующей молекулярной массе низкомолекулярного гепарина животного происхождения. Этот препарат обладал достаточно высокой антикоагулянтной активностью и способностью предотвратить тромботические осложнения. Следовательно, изучение гепариноидных препаратов из пионов весьма перспективно для клинической медицины. При дальнейшем исследовании новых растительных препаратов показано, что гепариноиды из пионов демонстрируют значительные преимущества перед другими лечебными средствами, поскольку не проявляют побочных отрицательных эффектов на кровь [18].

### Закключение

Установлено, что экстракт из корней селекционного пиона обладал антикоагулянтным и фибриндеполимеризационным эффектами, также при действии на предобразованный нестабилизированный фибрин

вызывал растворение свежесформированных фибриновых сгустков, что в перспективе может найти применение в клинической практике. Рассматривается возможный механизм действия экстракта из селекционного пиона на растворение фибрина в кровяном сгустке посредством ингибирования фермента тромбина.

### Литература

(п.п. 1-4; 6-8; 10; 11; 13; 16; 18 см. References)

- Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н., Макаров В.А., Левданский В.А., Мифтаков Н.Т. *Антикоагулянтное средство*. Патент № 2399377. Россия. 2009.
- Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови. *Анестезиология и реаниматология. Медицинская реабилитация*. 2015; 15(116)–16(117): 42–8.
- Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочнокветкового. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; (11): 1091–3.

14. Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Мелкумян А.Л., Козлов А.А., Нешкова Е.А. и др. *Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие* ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015.
15. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансед Солюшнз, 2012.
17. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А. и др. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения. *Медицинская наука и образование Урала*. 2012; 13(1): 163-70.

### References

1. de Oliveira Barddal H.P., Faria F.A.M., Nogueira A.V., Iacomini M., Cipriani T.R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated guar gum. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020; 145: 604-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.210>
2. Leite P.M., Miranda A.P.N., Gomes I., Rodrigues M.L., Amorim J.M., de Lima G.A.T.D., et al. Anticoagulant and antiplatelet activity of aqueous extracts of Citrus sinensis and Lippia alba : interactions and potential for the development of antithrombotics. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2022. 33(8): 457-62. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001168>
3. Parveen Abdul Rahim, Devika Rengaswamy Fibrinolytic Enzyme - An Overview. *Curr Pharm Biotechnol.* 2022; 23(11): 1336-45. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220104143113>
4. Wang R., Bai J., Yan G., Xiao Z., Chen K., Li K., et al. The enzymatic hydrolysate of fucoidan from Sargassum hemiphyllum triggers immunity in plants. *J. Plant Physiol.* 2023; 283: 153967. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.153967>
5. Kuznetsova S.A., Drozd N.N., Kuznetsov B.N., Makarov V.A., Levinsky V.A., Miftakov N.T. *Anticoagulant*. [Antikoagulyantnoe sredstvo]. Patent No. 2399377. Russia. 2009. (in Russian)
6. Ishihara M., Nakamura S., Sato Y., Takayama T., Fukuda K., Fujita M., et al. Heparinoid complex-based heparin-binding cytokines and cell delivery carriers. *Molecules*. 2019; (24): 4630. <https://doi.org/10.3390/molecules24244630>
7. Collicie-Jouault S., Bavington C., Delbarre-Ladrat C. Heparin-like entities from marine organisms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; 207: 423-49.
8. Zhao Dan-Dan, Jiang Li-Li, Li Hong-Yi, Yan Peng-Fei, Zhang Yan-Long. Chemical components and pharmacological activities of terpene natural products from the genus paeonia. *Molecules*. 2016; 21(10): 1362. <https://doi.org/10.3390/molecules21101362>
9. Krichevsky L.A. Low molecular weight heparins in the modern blood coagulation control system. Anesthesiology and intensive care. *Anesteziologiya i reanimatologiya. Meditsinskaya reabilitatsiya*. 2015; 15(116)-16(117): 42-8. (in Russian)
10. Xiong L., Qi Z., Zheng B., Li Z., Wang F., Liu J., et al. Inhibitory Effect of Triterpenoids from Panax ginseng on Coagulation Factor X. *Molecules*. 2017; 22(4): 649. <https://doi.org/10.3390/molecules22040649>
11. Ling-Hua Wei, Tian-Ran Chen, Hong-Bo Fang, Qiang Jin, Shui-Jun Zhang, Jie Hou, et al. Natural constituents of St. John's Wort inhibit the proteolytic activity of human thrombin. *Int J Biol Macromol.* 2019; (134): 622-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.181>
12. Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Maistrenko E.S. On the mechanism of anticoagulant action of extract from the roots of lactic-flowered peony. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016; (11): 1091-3. (in Russian)
13. Van Montfoort M.L., Meijers J.C. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting their intrinsic pathway. *Thromb. Haemost.* 2013; 110(2): 223-2.
14. Berkovsky A.L., Sergeeva E.V., Suворov A.V. Melkumyan A.L., Kozlov A.A., Neshkova E.A., et al. *Methods for determining the activity of heparin: teaching aid GBOU DPO «Russian Medical Academy of Postgraduate Education»*. [Metody opredeleniya aktivnosti geparina: uchebno-metodicheskoe posobie GBOU DPO «Rossiyskaya meditsinskaya akademiya posle diplomnogo obrazovaniya»]. Moscow: GBOU DPO RMAPO, 2015. (in Russian)
15. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Oborgan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the blood anticoagulant system*. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertvyayushchey sistemy krovi]. Moscow: Advanced Solutions, 2012. (in Russian)
16. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food Chem.* 2016; 202: 1-8.
17. Byshevsky A.Sh., Galyan S.L., Kalinin E.P., Karpova I.A., Rusakova O.A., Samoilov M.A., et al. Inhibitors of self-assembly of fibrin of plant origin. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2012; 13(1): 163-70. (in Russian)
18. Yin Qinan, Zhang Xiaoqin, Liao Suqing, Huang Xiaobo, Wa-Chunpeng Craig, Wang Yi. Potential anticoagulant of traditional chinese medicine and novel targets for anticoagulant drugs. *Phytomedicine*. 2023; 116: 154880. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154880>

### Сведения об авторах:

**Успенская Марианна Сергеевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Ботанического сада биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru;

**Ляпина Людмила Анисимовна**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: lyapinal@mail.ru;

**Сороколетов Сергей Михайлович**, проф., доктор мед. наук, зам. гл. врача ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗМ, e-mail: sorokoletov-sm@mail.ru;

**Мурашев Владимир Владимирович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. каф. физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: vla3053@yandex.ru;

**Калугина Марина Дмитриевна**, науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: laboratory7@mail.ru

© Коллектив авторов, 2024  
УДК 616-092.9

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

## Влияние гиперпродукции антител к белку фактора роста нервов у самок мышей во время беременности на развитие их потомства в гнездовом и раннем постгнездовом периодах развития

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

**Введение.** Высокий уровень антител (АТ) к такому белку как фактор роста нервов (ФРН) в организме беременных женщин коррелирует с состоянием здоровья новорожденных. В экспериментальных работах снижение уровня ФРН за счет использования специфических АТ является одним из способов изменений эффектов этого белка и изучения влияния его дефицита на развитие мозга и формирование поведения.

**Целью работы** являлось изучение влияния гиперпродукции антител к белку ФРН у мышей на развитие их потомства в гнездовом и раннем постгнездовом периодах развития.

**Методы.** Самок мышей ICR четырехкратно иммунизировали белком ФРН с адъювантами Фрейнда. От самок получали потомство, у которого изучали соматическое, сенсомоторное, когнитивное развитие в гнездовом периоде, а также тревожность, поведение оценки риска, двигательную активность в раннем постгнездовом периоде.

**Результаты.** Гиперпродукция АТ к ФРН у мышей во время беременности оказывала влияние на развитие их потомства после рождения. Были выявлены отставания в соматическом развитии, нарушения в формировании сенсомоторных координаций конечностей, задержки в формировании когнитивных способностей, повышенная тревожность и увеличенная двигательная активность.

**Заключение.** Вероятными причинами нарушений поведения, вызванных влиянием АТ к ФРН в периоды пренатального и постнатального развития мозга, являются изменения созревания холинергической системы базальных отделов переднего мозга. Полученные результаты дополняют данные о регуляторной функции ФРН в период развития нервной системы и могут быть использованы для поиска методов компенсации возникающих нарушений.

**Ключевые слова:** мыши; иммунизация; фактор роста нервов; антитела; соматическое; сенсомоторное; когнитивное развитие; тревожность; двигательная активность

**Для цитирования:** Лобанов А.В., Захарова И.А., Морозов С.Г. Влияние гиперпродукции антител к белку фактора роста нервов у самок мышей во время беременности на развитие их потомства в гнездовом и раннем постгнездовом периодах развития. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(2): 34-48.  
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.2.34-48

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

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

**Финансирование.** Исследование финансировалось по государственному заданию. Тема: FGfU-2022-0011.

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

Поступила 11.03.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

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

## Effect of nerve growth factor antibody overproduction in pregnant female mice on the development of their offspring in the nesting and early post-nesting periods of development

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

**Introduction.** A high level of antibodies to a protein such as nerve growth factor (NGF) in pregnant women correlates with the health of newborns. In experimental studies, reducing the NGF level by specific AT is a way to change the effects of this protein and to study the effect of its shortage on the development of brain and the formation of behavior. **The aim** of the work was to study

the effect of NGF antibodies overproduction in mice on the development of their offspring in the nesting and early post-nesting periods of development.

**Methods.** Female ICR mice were immunized four times with NGF protein with Freund's adjuvants. Females produced offspring that were studied for somatic, sensorimotor, and cognitive development during the nesting period, as well as anxiety, risk assessment behavior, and locomotor activity in the early postnesting period.

**Results.** NGF antibodies overproduction in pregnant mice affected the offspring development after birth. Retarded somatic development, disturbances in the formation of sensorimotor coordination of the limbs, delayed formation of cognitive abilities, increased anxiety, and increased motor activity were observed.

**Conclusion.** The likely cause of behavioral disorders induced by the NGF antibodies during the prenatal and postnatal brain development is abnormal maturation of the cholinergic system in the basal forebrain. The results of the study complement the knowledge about the NGF regulatory function during the development of the nervous system and can be used for finding methods of compensation for the emerging disorders.

**Keywords:** mice; immunization; nerve growth factor; antibodies; somatic; sensorimotor; cognitive development; anxiety; motor activity

**For citation:** Lobanov A.V., Zakharova I.A., Morozov S.G. Effect of nerve growth factor antibody overproduction in pregnant female mice on the development of their offspring in the nesting and early post-nesting periods of development. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 34-48. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.2.34-48

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

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

**Information about the authors:**

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

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

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

**Financing.** The study was funded by a government contract. Subject: FGFU-2022-0011.

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

Received 11.03.2024

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

## Введение

Иммуноопосредованный патогенез нервно-психических расстройств и нарушений развития нервной системы у детей может быть связан с действием материнских мозг-реактивных АТ [1]. Высокий уровень АТ к такому белку как ФРН в организме беременных женщин коррелирует с состоянием здоровья новорожденных [2].

Функции ФРН в процессе развития нервной системы связаны с регуляцией нейрогенеза, созревания, выживания нервных клеток. ФРН необходим для развития и фенотипического поддержания симпатических и чувствительных нейронов периферической нервной системы, а также для формирования и сохранения функциональной целостности холинергических нейронов центральной нервной системы [3]. Эффекты ФРН обнаруживаются, начиная с момента деления нейроэпителиальных стволовых клеток в эмбриогенезе [4]. Проекции холинергических волокон ба-

зальных отделов переднего мозга распространяются на всю новую кору и гиппокамп [5]. Установлено, что ФРН оказывает более сильное влияние на рост нейронов в гиппокампе чем в нижних отделах мозга [5]. ФРН регулирует не только выживание и дифференцировку нейронов, но также глиальные и микроглиальные функции и нейровоспаление [5]. Эффекты ФРН опосредуются его взаимодействием со специфическим рецептором тропомиозинкиназой А (TrkA) или низкоаффинным неселективным рецептором p75 (p75NTR) [3]. Экспрессия TrkA в пирамидных нейронах разных слоев неокортекса выявлена в постнатальном периоде у крыс и увеличивается в течение первых двух недель онтогенеза [6].

В экспериментальных работах роль ФРН изучалась на моделях с дефицитом как самого белка, так и его рецептора TrkA [5, 7-9], а также на моделях с усилением функции ФРН [8]. Например, отсутствие TrkA при-

водило к дефициту холинергических проекций из базального отдела переднего мозга у животных [5], направленная мутация гена, кодирующего ФРН, вызывала дефицит периферической сенсорной иннервации [7], снижение экспрессии ФРН у мутантных мышей вызывала нарушение приобретения и сохранения памяти [5]. Инфузия ФРН ослабляет поведенческие нарушения, связанные с холинергической атрофией [5].

Общепринятый метод создания эндогенной аутоиммунной модели у мышей – это иммунизация животных определенными белковыми эпитопами с использованием полного и неполного адъювантов Фрейнда [1]. Преимуществом такого метода является естественная имитация повышения уровня материнских аутоантител в период формирования мозга у потомства мышей. Создание экспериментальной модели выработки аутоантител к ФРН у самок мышей позволит изучить взаимосвязь между изменением уровня антител к ФРН у матерей и последующими нарушениями развития их потомства после рождения.

**Цель работы** – изучить влияния гиперпродукции АТ к белку ФРН у мышей на развитие их потомства в гнездовом и раннем постгнездовом периодах развития.

### Методика

В исследовании были использованы половозрелые самки и самцы мышей ICR, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, Пущино. Работы на животных проводили в лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИ-ОПП и были одобрены этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП (протоколы заседаний №2 от 04.04.23 и №5 от 10.10.23).

**Распределение животных по группам.** В исследовании было сформировано две группы самок мышей:

«Контроль» и «ФРН». Животных контрольной группы подвергали ложной иммунизации адъювантами Фрейнда, мышей экспериментальной группы подвергали иммунизации белком ФРН совместно с адъювантами Фрейнда.

Интактная группа мышей была изучена ранее в сравнительном исследовании развития потомства животных с ложной иммунизацией адъювантами Фрейнда и потомства мышей без воздействия [10]. В результате исследования были выявлены значительные отставания в соматическом и сенсомоторном развитии потомства мышей, получавших адъюванты, в сравнении с потомством интактной группы. Поэтому для избегания повторной оценки результатов иммунизации адъювантами Фрейнда и для фокусирования на специфических эффектах гиперпродукции АТ к ФРН в данной работе приведены данные только для контрольной группы с введением адъювантов и экспериментальной группы с введением ФРН с адъювантами.

Распределение животных по группам в эксперименте и протоколы иммунизации приведены в **таблице 1**.

**Иммунизация самок и получение потомства.** Для получения аутоиммунного ответа к белкам ФРН самок мышей экспериментальной группы четырехкратно иммунизировали. Первую иммунизацию проводили с использованием полного адъюванта Фрейнда, вторую, третью и четвертую иммунизации осуществляли с использованием неполного адъюванта Фрейнда. Возраст мышей при первой иммунизации был 8 недель. Интервал между первыми тремя иммунизациями составлял 10 дней, временной период между третьей и четвертой иммунизациями был 1 месяц. Ложную иммунизацию проводили по аналогичной схеме. Суспензия для подкожного введения одному животному группы «ФРН» готовилась из расчета 10 мкг белка ФРН (Cloud-Clone Corp, США) плюс 150 мкл физио-

Таблица 1/ Table 1

**Распределение животных по группам и протоколы иммунизации белком ФРН**  
**Distribution of animals into groups and protocols for immunization with NGF protein**

Группы / Groups	Введение веществ / Administration of substances	Число иммунизированных самок / Number of immunized females
Контроль / Control	150 мкл физраствора + 150 мкл адъюванта Фрейнда* / 150 µl saline + 150 µl Freund's adjuvant *	3
ФРН / NGF	10 мкг белка ФРН + 150 мкл физраствора + 150 мкл адъюванта Фрейнда* / 10 µg NGF protein + 150 µl saline + 150 µl Freund's adjuvant *	3

**Примечание.** \* – было проведено четыре иммунизации, первая иммунизация проводилась с использованием полного адъюванта Фрейнда, вторая, третья и четвертая с использованием неполного адъюванта Фрейнда.

**Note.** \* – four immunizations were carried out, the first immunization was carried out using complete Freund's adjuvant, the second, third and fourth using incomplete Freund's adjuvant.

логического раствора (ПанЭко, Россия), плюс 150 мкл полного или не полного адьюванта Фрейнда (Sigma, США). Суспензию для ложной иммунизации готовили из физиологического раствора (ПанЭко, Россия) и адьювантов Фрейнда (Sigma, США) без добавления белков. Введение осуществляли подкожно в зоны лимфатических узлов в 4-5 точках.

Самок контрольной и экспериментальной групп, у которых титр АТ к ФРН не менее 1:3200 после третьей иммунизации, на следующий день после четвертой ложной или четвертой истинной иммунизацией (табл. 1) ссаживали с интактными самцами в возрасте 10-16 недель для получения потомства. Ссадку проводили в 8:00 из расчета одна самка на одного самца. Через 15 дней после первого дня ссадки самцов удаляли из клетки. Примерно за три дня до родов беременным самкам в клетку добавляли стерильную вату для постройки гнезда.

*Тестирование животных в гнездовом периоде.* После рождения детенышей тестировали с 1 по 20 постнатальные сутки (ПС). Исследование пометов начинали на следующий день после рождения (1 ПС). Методы оценки соматического развития и сенсомоторного созревания у мышей описаны ранее [10].

Формирование поведения спуска с приподнятой платформы в чистую клетку или клетку с домашними опилками проводили с 10 по 18 ПС. Мышей сначала тестировали на спуск в чистую, а затем домашнюю клетку. Животное помещали в центр приподнятой платформы (куб 10×10×10) и наблюдали в течение 120 с. Определяли способность спуска с приподнятой платформы.

Формирование реакции отчаяния при невозможности избежать опасного положения изучали в тесте удерживания животного в приподнятом положении за хвост в течение 120 с. Оценивали число смыканий задних конечностей и всех (передних и задних) конечностей вместе, а также продолжительность таких смыканий.

Формирование ориентации в пространстве и рабочей пространственной памяти изучали с 9 по 14 ПС в Y-лабиринте (6×6 см). Тест состоял из трех подходов по 30 секунд, интервал между попытками составлял 60 с. При третьем проходе расположение отсека с домашними опилками меняли на противоположное относительно двух предыдущих. При первом помещении в лабиринт изучали способность ориентации в пространстве и выбор домашнего отсека, при третьем тестировании оценивали ориентацию в лабиринте с использованием пространственной рабочей памяти по заходу в чистый отсек.

В возрасте 5-6 недель животных тестировали в открытом поле (ОП) и на приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) по методике, описанной с предыдущей работе [11]. Исследования в каждом тесте проводили в отдельный день. Порядок тестирования был одинаковым для всех животных.

Эксперименты на животных проводили с 14:00 до 21:00 ч.

Положительный результат тестов соматического, сенсомоторного развития и реализации поведения оценивали как «1» (например, животное смогло схватить стержень, перевернуться на плоскости, спустится с приподнятой платформы), отрицательный результат тестов оценивали как «0».

*ИФА АТ к ФРН.* АТ к белку ФРН определяли в крови животных всех групп через 10 дней после третьей иммунизации (или ложной иммунизации). Образцы крови забирали из орбитального синуса для получения сыворотки. АТ в сыворотке крови определяли стандартным твердофазным методом ИФА [12].

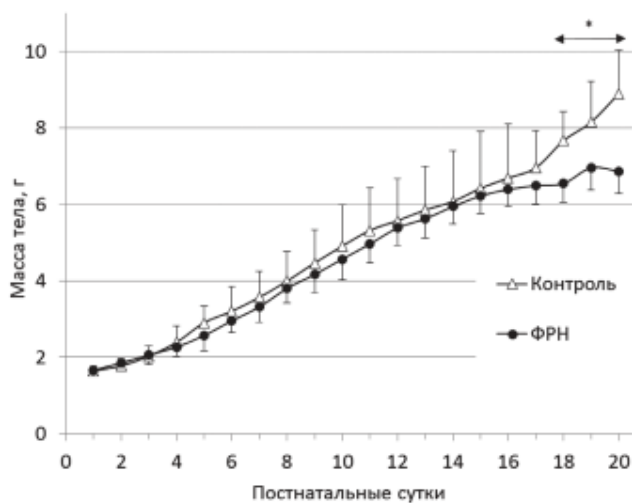
Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 7.1 (StatSoft, США). Для результатов, которые оценивались бинарно, вычисляли средние значения для группы в процентах. Для численных данных рассчитывали средние значения и стандартное отклонение или стандартные ошибки среднего. Бинарные данные сравнивали по Фишеру с определением критерия Chi2, численные – методом ANOVA, ANOVA2 тест Дункана.

## Результаты

*Влияние иммунизации самок мышей ФРН на развитие их потомства в гнездовом периоде.* В эксперименте в группе «Контроль» и в группе «ФРН» было получено по три помета. Количество детенышей в контрольной группе составляло 27 мышей, в экспериментальной группе – 26 мышей. В экспериментальной группе погибло одно животное (самец) на 13 ПС.

Иммунизация самок мышей белком ФРН вызывала нарушения соматического созревания их потомства. Изучение динамики массы тела выявило отставание в наборе массы тела мышей группы «ФРН» в сравнении с контролем в период с 18 по 20 ПС (рис. 1).

Животные экспериментальной группы также отставали в соматическом развитии от животных контрольной группы по таким параметрам развития, как появление первичной шерсти (5 ПС), отхождение ушных раковин (4 ПС), смыкание шерсти на животе (11 ПС) (табл. 2), расхождение пальцев передних (5 ПС) и задних конечностей (4-5 ПС) (табл. 3). Динамика проре-



**Рис. 1.** Динамика массы тела у потомства мышей, иммунизированных ФРН. Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение; \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA 2, тест Дункана).

**Fig. 1.** Dynamics of body weight in offspring mice immunized with NGF. Data are presented as arithmetic mean  $\pm$  standard deviation; \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (ANOVA 2, Duncan test).

звания резцов и открытия глаз у животных исследуемых групп не различалась (табл. 2).

Формирование сенсомоторных координаций изучалось в различных задачах по мере усложнения двигательных способностей в постнатальном периоде. В тесте схватывания палочки пальцами передней конечности у мышей экспериментальной группы было выявлено отставание от контроля в координации движений на 3 ПС (рис. 2, А). Координация движений передних и задних конечностей в ответ на тактильное раздражение живота у мышей экспериментальной группы формировалось с отставанием от контрольной группы на 10-11 ПС и 11-12 ПС, соответственно (рис. 2, Б, В). Координация движений передних конечностей при раздражении вибрисс у мышей группы «ФРН» также развивалась с задержкой относительно группы «Контроль» на 10-13 ПС (рис. 2, Г).

Более медленное развитие координации передних конечностей у мышей экспериментальной группы в сравнении с контролем на 14 ПС было выявлено в задаче избегания опасного положения с потерей опоры конечностей с использованием зрения (рис. 3, А). Отставание в формировании координаций у мышей

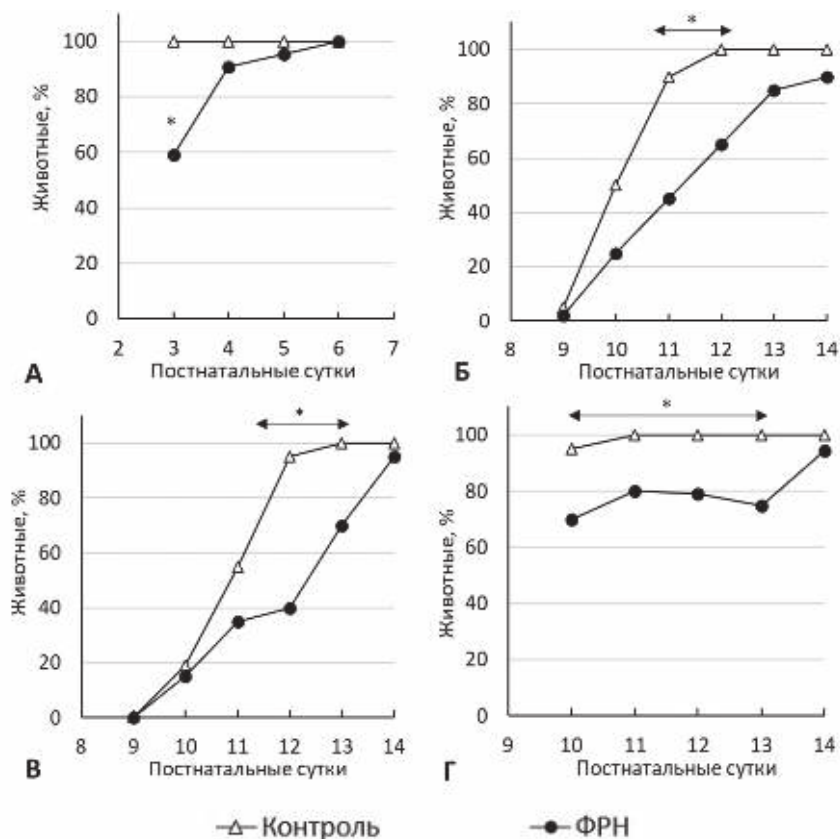
Таблица 2/ Table 2

**Соматическое развитие у потомства мышей, иммунизированных ФРН**  
**Somatic development in the offspring of mice immunized with NGF**

Показатели соматического развития / Indicators of somatic development	Группа / Group	Животные с проявлением соматического признака, % Animals with manifestation of somatic signs, %		
		3-е сутки / 3 <sup>rd</sup> day	4-е сутки / 4 <sup>th</sup> day	5-е сутки / 5 <sup>th</sup> day
Появление первичной шерсти / Fur appearance	Контроль / Control	0	3	96
	ФРН / NGF	0	4	70 *
Отхождение ушных раковин / Ear separation	Контроль / Control	5	86	100
	ФРН / NGF	0	52 *	95
		9-е сутки / 9 <sup>th</sup> day	10-е сутки / 10 <sup>th</sup> day	11-е сутки / 11 <sup>th</sup> day
Появление нижних Резцов / Incisors down appearance	Контроль / Control	0	71	100
	ФРН / NGF	4	75	100
		11-е сутки / 11 <sup>th</sup> day	12-е сутки / 12 <sup>th</sup> day	13-е сутки / 13 <sup>th</sup> day
Смыкание шерсти на животе / Fur closure in the ventral midline	Контроль / Control	65	95	100
	ФРН / NGF	25 *	85	100
		14-е сутки / 14 <sup>th</sup> day	15-е сутки / 15 <sup>th</sup> day	16-е сутки / 16 <sup>th</sup> day
Открытие глаз / Eyes opening	Контроль / Control	10	91	100
	ФРН / NGF	10	70	100

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ).

**Note.** \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test).



**Рис. 2.** Изменение формирования координации конечностей у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН.

Схватывание палочки пальцами передней конечности (А); координация движений передних (Б) и задних конечностей (Б) в ответ на тактильное раздражение живота; координация движение передних конечностей при раздражении вибрисс (Г). \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ).

**Fig. 2.** Changes in the formation of limb coordination in the offspring of female mice immunized with the NGF protein.

Grasping a stick with the fingers of the forelimb (A); coordination of movements of the forelimbs (B) and hind limbs (B) in response to tactile stimulation of the abdomen; coordination of the movement of the forelimbs during irritation of the whiskers (Г). \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test).

Таблица 3/ Table 3

**Расхождение пальцев на передних и задних конечностях у потомства мышей, иммунизированных ФРН**

**Divergence of the digits on the fore and hind limbs in the offspring of mice immunized with NGF**

Показатели соматического развития / Indicators of somatic development	Группа / Group	Число разошедшихся пальцев на конечностях / Number of separated digits on limbs		
		4-е сутки / 4 <sup>th</sup> day	5-е сутки / 5 <sup>th</sup> day	6-е сутки / 6 <sup>th</sup> day
Передние конечности / Forelimbs	Контроль / Control	0,54±1,70	5,00±0,00	5,00±0,00
	ФРН / NGF	0,33±1,59	4,42±0,28 *	5,00±0,00
Задние конечности / Hind limbs	Контроль / Control	0,86±0,18	4,76±0,17	5,00±0,00
	ФРН / NGF	0,33±0,16 *	3,52±0,34 *	5,00±0,00

**Примечание.** Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего; \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA-2, Duncan’s тест).

**Note.** Data are presented as arithmetic mean ± standard error of the mean; \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (ANOVA-2, Duncan’s test).



экспериментальной группы относительно контроля было выявлено в тестах: удерживания передними конечностями на горизонтальном канате на 6-9 ПС (рис. 3, Б), удерживания на сетке в положении головой вниз на 12-14 ПС (рис. 3, В), спуске по верительному канату на 16 и 18 ПС (рис. 3, Г), прохождения по приподнятой планке на 16-19 ПС (рис. 4, А).

Отставание в формировании способности согласованно координировать движения и проходить по планке совпадало с большим числом падений с приподнятой планке у этих животных на 18-19 ПС (рис. 4, Б).

Стремление мышей избегать ограниченную приподнятую платформу изучалось в варианте спуска с этой платформы в чистую и домашнюю клетки. При спуске

с платформы животные должны были преодолеть страх высоты. Во втором варианте мышам было легче преодолеть такой страх, т.к. они попадали в безопасное место с домашним запахом. При спуске в чистую клетку животные спускались в неизвестное место, что являлось дополнительным фактором стресса. Животные группы «ФРН» значительно реже спускались в чистую клетку чем мыши контрольной группы на 15-16 ПС (рис. 5, А) и на уровне тенденции на 11-18 ПС. Значимых различий в показателе латентного времени спуска в чистую клетку у мышей обеих групп не было (рис. 5, Б). Животные группы «ФРН» также значительно реже и медленнее спускались с приподнятой платформы в клетку с домашним запахом на 12-15 ПС (рис. 5, В, Г) в сравнении с показателя-

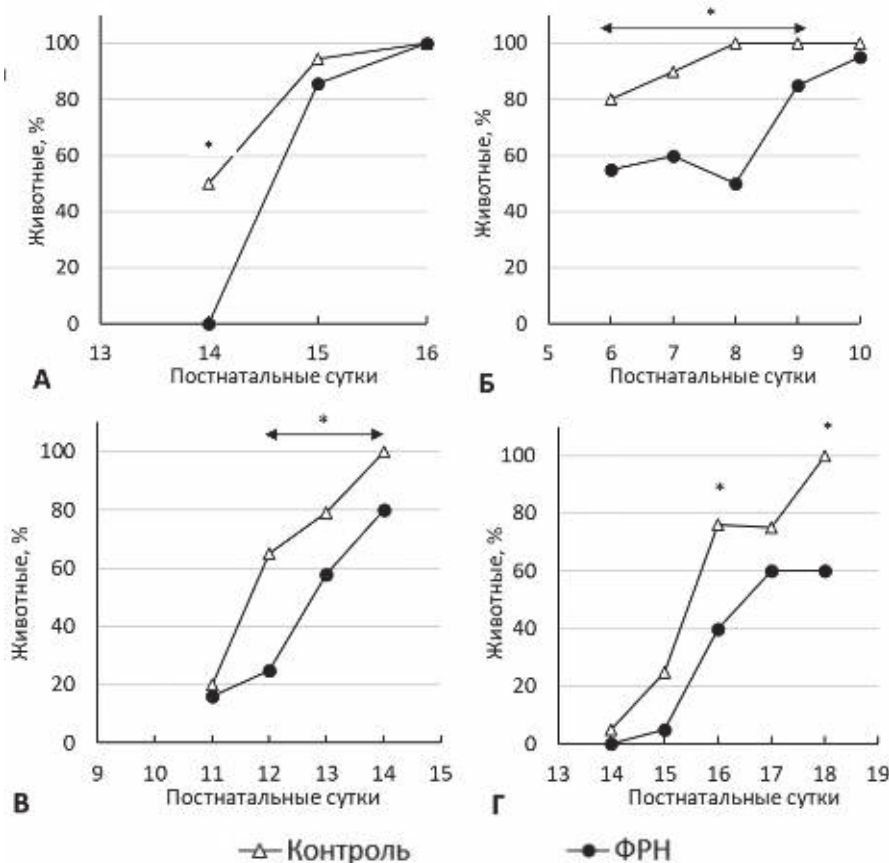


Рис. 3. Изменение формирования сенсомоторных координаций у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН.

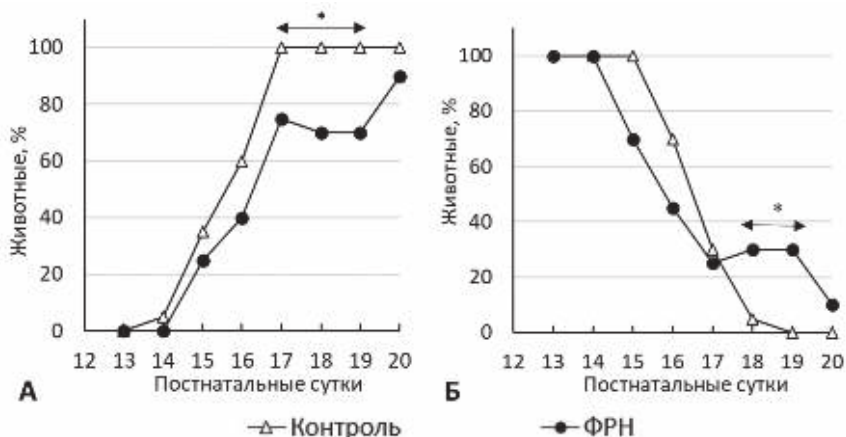
Координация движений передних конечностей при использовании зрения (А); удерживание передними конечностями на горизонтальном канате (Б); удерживание на сетке в положении головой вниз (В); спуск по верительному канату (Г). \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ).

Fig. 3. Changes in the formation of sensorimotor coordination in the offspring of female mice immunized with the NGF protein.

Coordination of movements of the forelimbs when using vision (A); holding the forelimbs on a horizontal rope (B); holding on the net in a head down position (B); descent along the crevice rope (G). \* –  $p < 0,05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test).

ми спуска у мышей группы «Контроль». Перед спуском с платформы животные в большинстве случаев сначала обследовали край платформы, для этого они находились на краю платформы, выглядывали за нее и совершали попытки спуска. Такое поведение на краю платформы являлось поведением оценки риска. Мыши экспериментальной группы в тесте с домашней клеткой, значимо

дольше находились на краю платформы, чем контрольные животные в тесте с чистой клеткой на 17 ПС и 12 ПС. В остальные дни исследования выявленные эффекты были на уровне тенденции. Число попыток спуска в чистую клетку у мышей группы «ФРН» было больше на 12 ПС и в домашнюю клетку на 17 ПС, чем у животных группы «Контроль», соответственно.

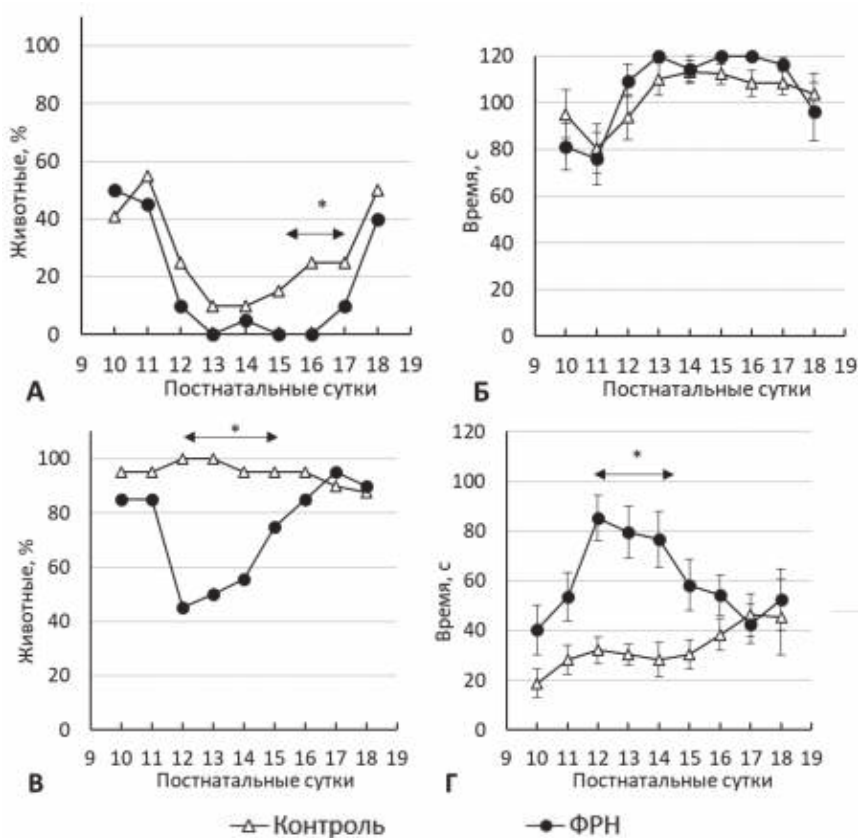


**Рис. 4.** Изменения в формировании способности проходить по приподнятой планке (дорожке) у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН.

Прохождение по планке (А); падение с планки (Б). \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ).

**Fig. 4.** Changes in the formation of the ability to walk along a raised bar (path) in the offspring of female mice immunized with the NGF protein.

Walking along the bar (A); falling from the bar (B). \* –  $p < 0,05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test).



**Рис. 5.** Изменения в формировании способности спускаться с приподнятой платформы у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН.

Спуск в чистую клетку (А); спуск в домашнюю клетку (Б). \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ). Время, требуемое для спуска в чистую клетку (В); время, требуемое для спуска в домашнюю клетку (Г). Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA-2, Duncan's test).

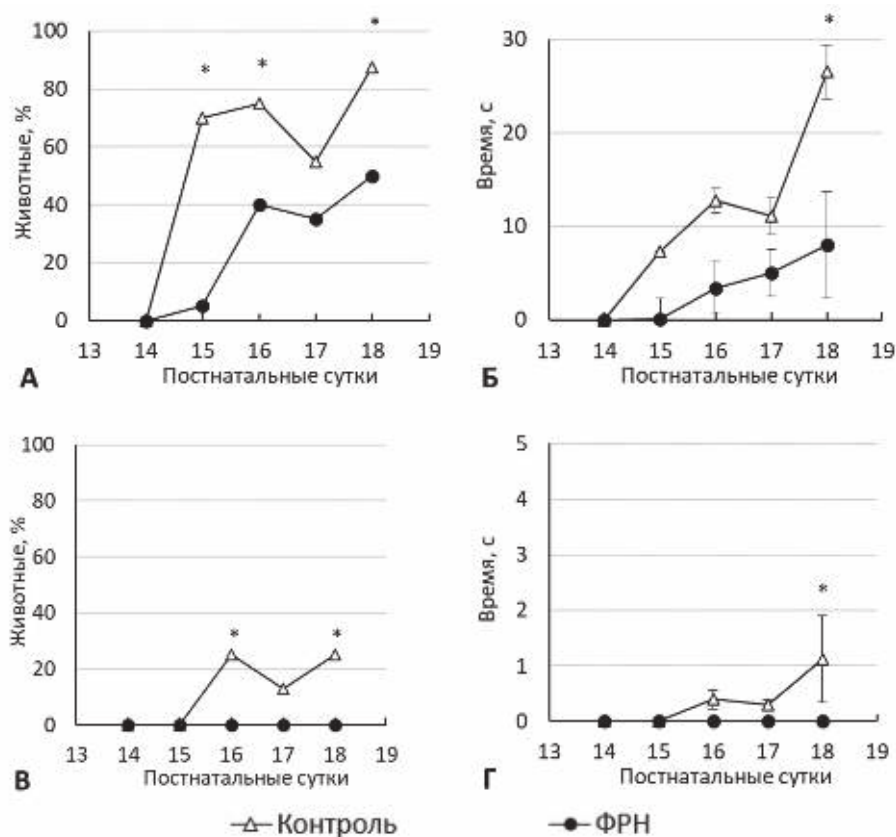
**Fig. 5.** Changes in the formation of the ability to descend from an elevated platform in the offspring of female mice immunized with the NGF protein.

Descent into a clean cage (A); descent to the home cage (B). \* –  $p < 0,05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test). Time required to descend into a clean cage (B); time required to descend to the home cage (Г). Data are presented as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean \* –  $p < 0,05$  relative to the control group (ANOVA-2, Duncan's test).

Несмотря на более выраженный страх, выявленный при спуске с приподнятой платформы, животные экспериментальной группы менее подвергались отчаянию при невозможности избежать опасного положения в течение 120 с теста удерживания за хвост. Отчаяние характеризовалось частотой и продолжительностью смыкания задних конечностей или всех конечностей (передние и задние) вместе. Животные экспериментальной группы значимо меньше смыкали задние конечности на 15-16 ПС (рис. 6, А), а также менее продолжительно удерживали соединенные задние конечности на 15, 16 и 18 ПС (рис. 6, Б) в сравнении с контролем. Смыкание вместе всех четырех конечностей у животных экспериментальной группы было бо-

лее редким на 16, 18 ПС (рис. 6, В) и менее продолжительным на 18 ПС относительно контроля (рис. 6, Г).

Формирование когнитивных способностей у мышей изучалось в Y-образном лабиринте по показателю ориентации в пространстве при первом обследовании лабиринта и ориентации по памяти при третьем помещении в лабиринт. У мышей экспериментальной группы развитие способности ориентироваться в пространстве и находить отсек с домашними опилками происходило с задержкой на 9 ПС (рис. 7, А) в сравнении с контролем. Время, которое требовалось для захода в домашний отсек, было более продолжительным у животных экспериментальной группы на 10-11 ПС (рис. 7, Б).



**Рис. 6.** Изменения в формировании отчаяния у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН.

Смыкание лап задних конечностей (А); смыкание лап всех конечностей (передних и задних) (В). \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ). Время смыкания лап задних конечностей (Б); время смыкания лап всех конечностей (Г). Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA-2, Duncan's тест).

**Fig. 6.** Changes in the formation of despair in the offspring of female mice immunized with the NGF protein.

Closing the paws of the hind limbs (A); closing of the paws of all limbs (front and rear) (B). \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test). Time of closing the paws of the hind limbs (B); time of closing of the paws of all limbs (G). Data are presented as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (ANOVA-2, Duncan's test).

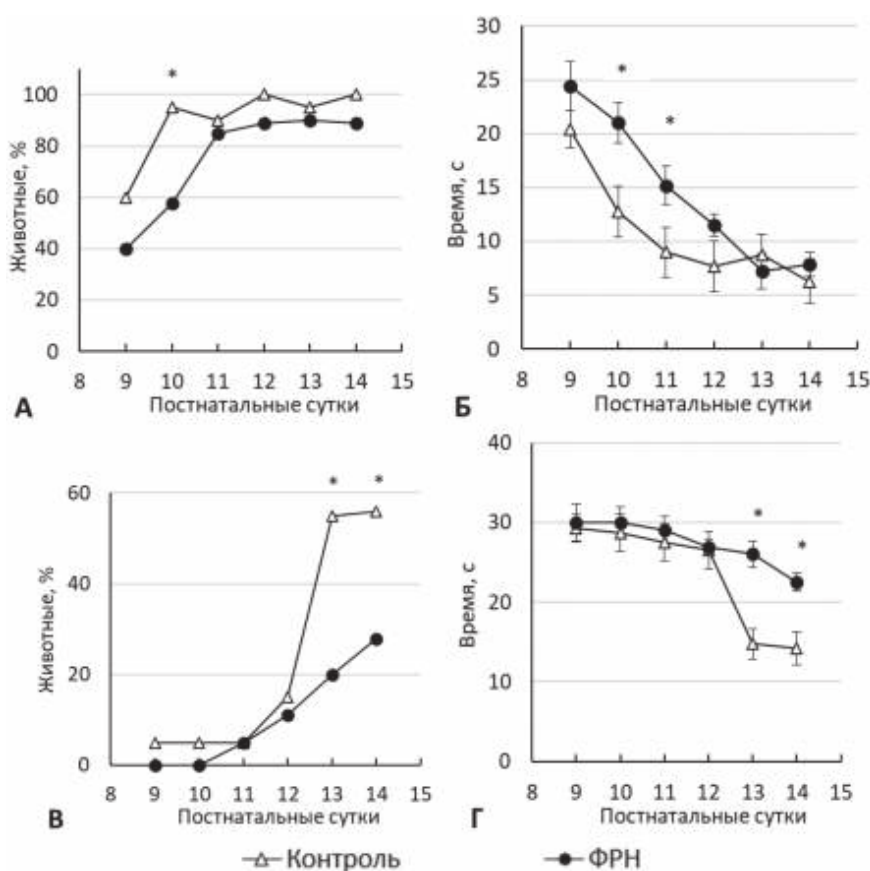
У группы «ФРН» было выявлено отставание в формировании пространственной рабочей памяти относительно группы «Контроль» на 13-14 ПС (рис. 7, В, Г).

Влияние иммунизации самок мышей ФРН на поведение их потомства в раннем постгнездовом периоде. Исследование животных в тесте ОП и ПКЛ проводили в возрасте 5-6 недель, отдельно для самцов и самок.

Различия в поведении в ОП были выявлены только у самок экспериментальной и контрольной групп. Самки мышей группы «ФРН» проявляли большую двигательную активность, что характеризовалось увели-

чением времени активности, увеличением пройденной дистанции и уменьшением продолжительности отдыха (табл. 4).

Параметры поведения в центральном квадрате, которые характеризуют тревожность, у мышей всех групп не отличались. Однако в тесте ПКЛ животные экспериментальной группы обоего пола проявляли большую тревожность и меньше оценивали риск. Увеличение тревожности у самцов группы «ФРН» характеризовалось более редкими заходами в открытый рукав и увеличением числа болюсов, у самок эксперимен-



**Рис. 7.** Изменения в формировании когнитивных способностей в Y-образном лабиринте у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН. Способность найти отсек с домашними опилками при первом посещении лабиринта (А); способность выбрать чистый отсек при третьем посещении лабиринта (В). \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий  $\chi^2$ ).

Время захода в домашний отсек при первом посещении лабиринта (Б); время выбора чистого отсека при третьем посещении лабиринта (Г). Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA-2, Duncan's test).

**Fig. 7.** Changes in the formation of cognitive abilities in the Y-maze in the offspring of female mice immunized with the NGF protein.

Ability to find a compartment with household sawdust on the first visit to the maze (A); ability to choose a clean compartment on the third visit to the maze (B). \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (Fisher,  $\chi^2$  test). Time of entering the home compartment when visiting the maze for the first time (B); time of choosing a clean compartment on the third visit to the maze (F). Data are presented as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (ANOVA-2, Duncan's test).

тальной группы – более редкими заходами в открытые рукава, увеличением числа болюсов, более коротким периодом пребывания в открытом рукаве и более продолжительным нахождением в закрытом рукаве в сравнении с поведением самцов и самок контрольной группы, соответственно. Уменьшение числа выглядываний из закрытого лабиринта в область центрального квадрата было выявлено у мышей обоего пола экспериментальной группы в сравнении с контролем (снижения поведения оценки риска у животных группы «ФРН») (табл. 5).

### Обсуждение

В проведенном нами исследовании было выявлено, что повышение уровня АТ к ФРН у самок мышей во время беременности вызывало нарушение соматического, сенсомоторного и когнитивного созревания их потомства, а также оказывало влияние на тревожное и депрессивное поведение этих животных.

Влияние ФРН на динамику массы тела выявлена в различных экспериментальных исследованиях. Инфузия ФРН гибридным самцам крыс F344/BN в течение 2 недель вызывала увеличение массы тела, как предполагается, за счет холинергической стимуля-

цией прилежащего ядра [13]. Известно, что дефицит ФРН во время развития снижает плотность иннервации периферической симпатической нервной системы (легкие, сердце, сосуды, печень, поджелудочная железа, толстая кишка, селезенка, тимус, почки и мочевой пузырь) [14, 15]. Возможно, что нарушение формирования симпатической стимуляции внутренних органов оказывало влияние на динамику массы тела и вызывало задержку формирования других соматических признаков у мышей в нашем исследовании. Положительная корреляция между сниженной массой тела и нарушением симпатической регуляции сердечно-сосудистой системы показана у плодов овец [16]. Изменение ФРН-зависимого роста аксонов симпатических нейронов выявлено у дистрофических мышей [17]. Роль ФРН, как метаболитического фактора, действующего на глюкозный и энергетический обмен, бета-клетки поджелудочной железы и сердечно-сосудистый гомеостаз обсуждается в обзорной статье В. Карито с коллегами [18].

В проведенном исследовании были показаны значительные отставания в формировании сенсомоторных координаций конечностей на протяжении всего гнездового периода от простых движений пальцев

Таблица 4/Table 4

Поведение в открытом поле у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН, в возрасте 5 недель  
Behavior in the open field in the offspring of female mice immunized with NGF protein at the age of 5 weeks

Параметры поведения / Behavior Parameters	Группы / Groups			
	Контроль самцы / Control males	ФРН самцы / NGF males	Контроль самки / Control females	ФРН самки / Control females
Общая дистанция, см / Total distance, cm	2848±196	2928±145	2378±218	3046±163*
Время двигательной активности, с / Motor activity time, s	80,0±2,92	87,7±2,09	77,3±3,56	86,7±2,0*
Время отдыха, с / Rest time, s	40,0±2,92	32,1±3,78	44,7±3,78	33,3±2,10 *
Дистанция в центре, см / Distance in center, cm	135±36,3	96,1±16,1	79,1±18,9	142±29,2
Время в центре, с / Time at center, s	4,40±0,92	4,06±0,74	6,88±2,69	5,47±1,12
Средняя скорость на всей площадке, см/с / Average speed over the open field, cm/s	32,3±1,63	32,1±1,11	0,3±2,48	33,9±1,38
Продолжительность гиперактивности, с / Duration of hyperactivity, s	36,9±2,42	38,2±1,80	33,78±3,28	39,74±13,4
Число стоек на периферии / Number of rear on the periphery	2,12±0,44	2,42±0,39	2,14±0,35	2,68±0,49

**Примечание.** Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего. \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA-2, Duncan's test).

**Note.** Data are presented as arithmetic mean ± standard error of the mean. \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (ANOVA-2, Duncan's test).

в первые дни после рождения и заканчивая сложными координациями при перемещении по приподнятой планке в возрасте трех недель. Исследованные двигательные реакции формировались в ответ на тактильные раздражения кожи и вибриссы, а также при обработке зрительной информации. Причинами выявленных нарушений могут являться изменения в формировании таламокортикальных, внутрикортикальных и кортикофугальных связей участвующих в обработке сенсорной информации разной модальности в областях соматосенсорной и зрительной коры и регуляции движений в моторной коре, связанные с дефицитом ФРН [19].

Известно, что холинергические нейроны базального отдела переднего мозга, в развитии и функционировании которых важную роль играет ФРН (путь ФРН/trkA), модулируют когнитивные функции [20]. Нарушение холинергической иннервации базальных нейронов, связанное с потерей синапсов между базальным отделом переднего мозга и тканями-мишенями гиппокампа и коры коррелирует с потерей памяти при нейродегенеративных расстройствах. ФРН широко исследуется как кандидат на терапию при неврологических заболеваниях с холинергической дисфункцией, например, болезни Альцгеймера и деменции с тельцами Леви [21]. В мышинной модели болез-

ни Альцгеймера Ts65Dn метаболический дефицит ФРН вызывал недоразвитие холинергических нейронов переднего мозга и когнитивные нарушения [22]. В проведенном нами исследовании воздействие материнских антител к ФРН влияло на формирование когнитивных способностей, таких как ориентация в пространстве и формирование пространственной рабочей памяти в раннем онтогенезе и, вероятно, также было связано с нарушением нейротрофической функции ФРН в отношении холинергических нейронов переднего мозга. Дальнейшее изучение когнитивных способностей у потомства иммунизированных мышей во взрослом и старом возрасте позволит оценить последствия раннего воздействия антител к ФРН на обучаемость и память в течение последующего онтогенеза.

Участие ФРН в тревожном поведении у мышей выявлено при тестировании в ПКЛ [23]. Степень тревожноподобного поведения в ПКЛ связана с уровнем ФРН в дорсальном гиппокампе и миндалевидном теле. Снижение тревожного поведения происходит при субхроническом лечении животных литием и связано с изменением уровня ФРН в префронтальной коре, гиппокампе, миндалевидном теле и лимбической системе переднего мозга [24]. Степень тревожного поведения в приподнятом крестообразном

Таблица 5/Table 5

**Поведение в приподнятом крестообразном лабиринте у потомства самок мышей, иммунизированных белком ФРН, в возрасте 5 недель**  
**Behavior in the elevated plus maze in the offspring of female mice immunized with NGF protein at the age of 5 weeks**

Параметры поведения / Behavior Parameters	Группы / Groups			
	Контроль самцы / Control males	ФРН самцы / NGF males	Контроль самки / Control females	ФРН самки / Control females
Число заходов в открытый рукав / Number of entries into open arm	3,00±2,00	0,40±0,24	3,83±1,77	1,00±0,31
Число заходов в закрытый рукав / Number of entries into a closed arm	13,0±1,95	2,20±0,48 *	12,8±1,32	2,20±1,20 *
Время в открытых рукавах, с / Time in open arms, s	33,7±16,5	6,80±4,27	33,5±8,96	6,20±4,47 *
Время в закрытых рукавах, с / Time in closed arms, s	246±20,5	268±9,65	200±37,6	292±4,13 *
Число выглядываний из закрытого рукава в центральную часть / Number of peeks from a closed arms into the central part	15,2±2,28	6,40±0,24 *	14,2±1,89	4,80±0,87 *
Болюсы / Boluses	0,56±0,23	6,40±0,93 *	0,33,3±0,21	5,80±0,53 *

**Примечание.** Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего. \* –  $p < 0,05$  относительно контрольной группы (ANOVA-2, Duncan's test).

**Note.** Data are presented as arithmetic mean ± standard error of the mean. \* –  $p < 0.05$  relative to the control group (ANOVA-2, Duncan's test).

лабиринте положительно связана с уровнями нейротрофического фактора мозга в дорсальном гиппокампе, но отрицательно связана с уровнями ФРН в дорсальном гиппокампе и миндалевидном теле [25]. В нашем исследовании нарушения, связанные со страхом и тревогой, впервые проявлялись в двухнедельном возрасте и могли происходить из-за нарушений в созревании лимбо-кортикальных связей (цепей тревожности) [26], которые формируются у мышей на 14 ПС [26]. В постгнездовом периоде развития тревожность у тестируемых животных была выявлена в тесте ПКЛ. Наблюдался половой диморфизм с более выраженной тревогой у самок. Такая же гипертревожность у самок по сравнению с самцами выявлена в исследовании других авторов и связана с генетической вариацией выработки ФРН [27]. Половые различия объясняются различиями в уровнях ФРН миндалевидном теле и гиппокампе у самцов и самок, зависимостью активности ФРН от концентрации эстрогена и прогестерона [28]. В нашем исследовании более высокая тревожность у самок мышей в постгнездовом периоде сочеталась с элементами гиперактивного поведения у этих животных в ОП. Полученные результаты согласуются с ранее установленной взаимосвязью тревоги и синдрома дефицита внимания с гиперактивностью, которые связаны с действием ФРН и зависят от пола [28]. У старых самок мышей конъюнктивное введение специфических антител к ФРН в отличие от результатов нашего исследования снижало тревожные поведенческие реакции [29].

Изучение поведения мышей в тесте удерживания за хвост показало, что воздействие материнских антител к ФРН замедляло формирование поведения отчаяния у мышей в раннем онтогенезе. Такой эффект был выявлен впервые. В доклинических исследованиях различных фармакологических препаратов для лечения депрессии показана взаимосвязь между снижением ФРН в гиппокампе и усилением поведения отчаяния у животных [30]. У людей снижение экспрессии ФРН и/или TrkA в гиппокампе коррелирует с депрессией [31]. Можно предположить, что дефицит ФРН, вызванный действием материнских АТ, в дальнейшем онтогенезе приведет формированию депрессивного поведенческого фенотипа.

ФРН действует не только на нервные клетки, но также влияет на глиальные клетки и микроглию. Известно, что ФРН регулирует олигодендрогенез, уменьшая миелинизацию в центральной нервной системе [32], а его дефицит может приводить к преждевременной миелинизации в мозге мышей и влиять на

поведение животных [33]. Взаимодействуя с микроглией ФРН направляет её к нейропротекторному и противовоспалительному фенотипу. Известно, что активация нейровоспаления нарушает формирование мозга и модулирует изменение поведения животных [34]. Дополнительным механизмом нарушения поведения в постнатальном периоде в нашем исследовании могла быть активация микроглии, вызванная недостатком ФРН.

Таким образом, моделирование эндогенной выработки АТ к ФРН у самок мышей вызвало нарушения постнатального развития их потомства. Вероятными причинами нарушений поведения, вызванных влиянием АТ к ФРН в периоды пренатального и постнатального нейрогенеза, являются аномалии созревания холинергической системы базальных отделов переднего мозга. Полученные результаты дополняют данные о регуляторной функции ФРН в период развития нервной системы и могут быть использованы для поиска методов компенсации возникающих нарушений. Особое практическое значение, в связи с этим, будет иметь изучение взаимосвязи между воздействием АТ к ФРН в раннем онтогенезе и ускоренной нейродегенерацией с потерей когнитивных способностей у взрослых животных в последующем.

### Литература

#### (п.п. 1-9; 12-34 см. References)

10. Лобанов А.В., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., Морозов С.Г. Раннее соматическое и сенсомоторное развитие потомства от мышей с введением полного адьюванта Фрейнда до беременности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(3): 29-38. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.03.29-38>
11. Лобанов А.В., Перепеченова Н.А., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., Морозов С.Г. Влияние пренатального и постнатального воздействия антител к белку S100B на формирование поведения мышей в детском и подростковом возрасте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(4): 49-60. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.49-60>

### References

1. Jones K.L., Pride M.C., Edmiston E., Yang M., Silverman J.L., Crawley J.N., et al. Autism-specific maternal autoantibodies produce behavioral abnormalities in an endogenous antigen-driven mouse model of autism. *Mol Psychiatry*. 2020; 25(11): 2994-3009. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0126-1>
2. Poletaev A.B., Morozov S.G. Changes of maternal serum natural antibodies of IgG class to proteins MBP, S100, ACBP14/18 and MP65 and embryonic misdevelopments in humans. *Human Antibody*. 2000; 9: 215-21. PMID: 11341175
3. Gioiosa L., Iannitelli A., Aloe L. Stress, anxiety and schizophrenia and neurotrophic factors: the pioneer studies with nerve

- growth factor. *Riv Psichiatr.* 2009; 44(2): 88-94. <https://doi.org/10.1708/420.4978>
4. Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med.* 2012; 29(10): 239. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-239>
  5. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 1990; 5(4): 501-9. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90089-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90089-X)
  6. Sakamoto H., Kuzuya H., Tamaru M., Sugimoto S., Shimizu J., Fukushima M., et al. Developmental changes in the NGF content in the brain of young, growing, low-birth-weight rats. *Neurochem Res.* 1998; 23(1): 115-20. <https://doi.org/10.1023/a:1022465807253>
  7. Kwon H.J., Lee K.Y., Park I.K., Park M.S., Lee M.Y., Kim M.K. Expression of tyrosine kinase A in the cerebral cortex of postnatal developing rat. *J Vet Sci.* 2005; 6(3): 185-9.
  8. Yang W., Sung K., Zhou F., Xu W., Rissman R.A., Ding J., et al. Targeted Mutation (R100W) of the Gene Encoding NGF Leads to Deficits in the Peripheral Sensory Nervous System. *Front Aging Neurosci.* 2018; 13: 10: 373. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00373>
  9. Calvo-Enrique L., Lisa S., Vicente-García C., Deogracias R., Arévalo J.C. Enhanced TrkA signaling impairs basal forebrain-dependent behavior. *Front Mol Neurosci.* 2023; 16: 1266983. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1266983>
  10. Lobanov A.V., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G. Early somatic and sensorimotor development of mice offspring with the introduction of a complete Freund's adjuvant before pregnancy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2023; 67(3): 29-38. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.03.29-38>
  11. Lobanov A.V., Perepechenova N.A., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G. The effect of prenatal and postnatal exposure to antibodies to the S100B protein on the behavior of mice in nesting and juvenile periods of development. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(4): 49-60. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.49-60> (in Russian)
  12. Davydov D.M., Lobanov A.V., Morozov S.G., Gribova I.E., Murashev A.N. Neurodevelopment and phenotype-modulating functions of S100B protein: a pilot study. *Physiol Behav.* 2015; 140: 188-96. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.037>
  13. Williams L.R., Oostveen J.A. Sensitivity of Fischer 344 x brown Norway hybrid rats to exogenous NGF: weight loss correlates with stimulation of striatal choline acetyltransferase. *Neurosci Lett.* 1992; 147(2): 136-8.
  14. Lommatzsch M., Quarcoo D., Schulte-Herbrüggen O., Weber H., Virchow J.C., Renz H., et al. Neurotrophins in murine viscera: a dynamic pattern from birth to adulthood. *Int J Dev Neurosci.* 2005; 23(6): 495-500. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.05.009>
  15. Pius-Sadowska E., Machaliński B. Pleiotropic activity of nerve growth factor in regulating cardiac functions and counteracting pathogenesis. *ESC Heart Fail.* 2021; 8(2): 974-87. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13138>
  16. Frasch M.G., Müller T., Wicher C., Weiss C., Löhle M., Schwab K., et al. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *J Physiol.* 2007; 579(Pt 3): 893-907. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124800>
  17. Lombardi L., Persiconi I., Gallo A., Hoogenraad C.C., De Stefano M.E. NGF-dependent axon growth and regeneration are altered in sympathetic neurons of dystrophic mdx mice. *Mol Cell Neurosci.* 2017; 80: 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.01.006>
  18. Carito V., Ceccanti M., Tarani L., Ferraguti G., Chaldakov G.N., Fiore M. Neurotrophins' Modulation by Olive Polyphenols. *Curr Med Chem.* 2016; 23(28): 3189-97. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160627104022>
  19. Caleo M., Maffei L. Neurotrophins and plasticity in the visual cortex. *Neuroscientist.* 2002; 8(1): 52-61. <https://doi.org/10.1177/107385840200800110>
  20. Calvo-Enrique L., Lisa S., Vicente-García C., Deogracias R., Arévalo J.C. Enhanced TrkA signaling impairs basal forebrain-dependent behavior. *Front Mol Neurosci.* 2023; 16: 1266983. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1266983>
  21. Madokoro Y., Kato D., Tsuda Y., Arakawa I., Suzuki K., Sato T. Direct enhancement effect of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide on cholinergic activity in the hippocampus. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(10): 8916. <https://doi.org/10.3390/ijms24108916>
  22. Velazquez R., Ash J.A., Powers B.E., Kelley C.M., Strawderman M., Luscher Z.I., et al. Maternal choline supplementation improves spatial learning and adult hippocampal neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis.* 2013; 58: 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.04.016>
  23. Jockers-Scherübl M.C., Zubraegel D., Baer T., Linden M., Danker-Hopfe H., Schulte-Herbrüggen O., et al. Nerve growth factor serum concentrations rise after successful cognitive-behavioural therapy of generalized anxiety disorder. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31(1): 200-4. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.09.006>
  24. Hellweg R., Lang U.E., Nagel M., Baumgartner A. Subchronic treatment with lithium increases nerve growth factor content in distinct brain regions of adult rats. *Mol Psychiatry.* 2002; 7(6): 604-8. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001042>
  25. Yee B.K., Zhu S.W., Mohammed A.H., Feldon J. Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice. *J Neural Transm (Vienna).* 2007; 114(4): 431-44. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0548-9>
  26. Bajic D., Craig M.M., Borsook D., Becerra L. Probing Intrinsic Resting-State Networks in the Infant Rat Brain. *Front Behav Neurosci.* 2016; 10: 192. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00192>
  27. Lang U.E., Hellweg R., Bajbouj M., Gaus V., Sander T., Gallinat J. Gender-dependent association of a functional NGF polymorphism with anxiety-related personality traits. *Pharmacopsychiatry.* 2008; 41(5): 196-9. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1082070>
  28. Bjorling D.E., Beckman M., Clayton M.K., Wang Z.Y. Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience.* 2002; 110(1): 155-67. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00568-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00568-1)
  29. Berry A., Aloe L., Rossi S., Bonsignore L.T., Capone F., Alleve E., et al. Conjecturally administered NGF antibody reduces pain sensitivity and anxiety-like behavioral responses in aged female mice. *Behav Brain Res.* 2010; 210(2): 284-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.037>
  30. Hashikawa-Hobara N., Otsuka A., Ishikawa R., Hashikawa N. Roman chamomile inhalation combined with clomipramine treatment improves treatment-resistant depression-like behavior in mice. *Biomed Pharmacother.* 2019; 118: 109263. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109263>
  31. Erbay L.G., Karlıdağ R., Oruç M., Çiğremiş Y., Celbiş O. Association of BDNF / TrkB and NGF / TrkA levels in postmortem brain



- with major depression and suicide. *Psychiatr Danub.* 2021; 33(4): 491-8. <https://doi.org/10.24869/psyd.2021.491>
32. Brandi R., Fabiano M., Giorgi C., Arisi I., La Regina F., Malerba F., et al. Nerve Growth Factor Neutralization Promotes Oligodendrogenesis by Increasing miR-219a-5p Levels. *Cells.* 2021; 10(2): 405. <https://doi.org/10.3390/cells10020405>
33. Kikusui T., Mori Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *J Neuroendocrinol.* 2009; 21(4): 427-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01837.x>
34. Solek C.M., Farooqi N., Verly M., Lim T.K., Ruthazer E.S. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn.* 2018; 247(4): 588-619. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24612>

**Сведения об авторах:**

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

**Захарова Ирина Александровна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

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

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092

Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Политидис Р.Р.

**Исходы коронавирусной пневмонии COVID-19 с поражением почек**Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,  
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

**Цель.** Оценить исходы коронавирусной пневмонии COVID-19 с поражением почек у пациентов в зависимости от наличия сопутствующей патологии в динамике.

**Методика.** Проведен ретроспективный анализ методом случайной выборки 300 историй болезней пациентов старше 18 лет без летальных исходов, поступивших на стационарное лечение по поводу коронавирусной инфекции, осложнившейся пневмонией, и не имевших в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы. Из 300 оцененных историй болезней в 103 (34,3%) были выявлены те или иные изменения в анализах мочи, составившие исследуемую группу по сравнению с пациентами, не имеющими изменений в анализах мочи (группа сравнения). Пациентам проводили: клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, компьютерную томографию легких (КТ), выявление вируса COVID-19 методом полимеразной цепной реакции в мазках из ротоглотки и носоглотки. Пациентов исследуемой группы с изменениями в анализах мочи после выписки из стационара через 6-7 месяцев обзванивали и уточняли состояние здоровья и самочувствие.

**Результаты.** В нашем исследовании достоверно наиболее часто изменения в анализах мочи установлены при коронавирусной пневмонии средней степени тяжести КТ-2. Из 300 больных с коронавирусной пневмонией (основное заболевание) у 170 (56,7%) пациентов была выявлена дополнительно сопутствующая патология ( $p < 0,01$ , критерий  $\chi$ -квадрат). В исследуемой группе (коронавирусная пневмония COVID-19 с поражением почек) сопутствующие заболевания выявлялись достоверно чаще (65 (63,1%),  $p < 0,01$ , критерий  $\chi$ -квадрат) при сравнении с пациентами без изменений в анализах мочи). Наиболее часто у пациентов исследуемой группы выявлялись ГБ – 34 (33%) ( $p < 0,01$ , критерий  $\chi$ -квадрат), СД – 14 (13,6%) и ожирение – 8 (7,8%), в группе сравнения наблюдалась подобная картина. Сопутствующая патология в нашем случае достоверно чаще встречалась у пациентов с повышенными значениями креатинина в сыворотке крови – 42 (24,7%) и 20 (15,4%) ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат), а остальные показатели не имели достоверной разницы. Наличие изменений в анализах мочи сопровождалось достоверным выявлением протеинурии и лейкоцитурии в группах как с наличием сопутствующей патологии, так и без таковой.

**Заключение.** Спустя 6 месяцев после перенесенной коронавирусной пневмонии COVID-19 с поражением почек, после выписки из стационара, практически 30% пациентов нуждаются в дальнейшем динамическом наблюдении и не получают рекомендаций по наблюдению специалистами.

**Ключевые слова:** коронавирусная инфекция; пневмония; ассоциированная с COVID-19; общий анализ мочи; повреждение почек; протеинурия; лейкоцитурия

**Для цитирования:** Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Политидис Р.Р. Исходы коронавирусной пневмонии COVID-19 с поражением почек. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(2): 49-56.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.49-56

**Участие авторов:** Александрова С.Г. – главный исследователь: набор пациентов, обработка материала, статистический анализ, написание публикации; Бычкова Л.В. – научный консультант, редактирование статьи; Александрова М.Р., Политидис Р.Р. – помощь в наборе пациентов. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Александрова Светлана Григорьевна, e-mail: alexandrova-sg@rudn.ru

**Финансирование.** Исследование не имело финансовой поддержки.

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

Поступила 29.02.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

Aleksandrova S.G., Bychkova L.V., Aleksandrova M.R., Politidis R.R.

## Outcomes of COVID-19 coronavirus pneumonia with kidney damage

Medical Institute, Russian University of Peoples' Friendship,  
8 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russian Federation

**Aim:** To evaluate the outcomes of COVID-19 coronavirus pneumonia with kidney damage depending on the presence and dynamics of concomitant pathology.

**Methods.** A retrospective analysis was performed of 300 case reports of patients over the age of 18 years without fatal outcomes, who were admitted to a hospital for coronavirus infection complicated by pneumonia and had no history of urinary tract diseases. 103 of 300 evaluated clinical records (34.3%) showed changes in urine tests and constituted the study group to be compared with patients who had no changes in urine tests (comparison group). Clinical and biochemical blood tests, clinical urinalysis, computed tomography (CT) of the lungs, and detection of the COVID-19 virus by polymerase chain reaction in oropharyngeal and nasopharyngeal smears had been performed in all patients. At 6-7 mos after discharge from the hospital, patients of the study group with changes in their urinary tests were contacted and interviewed about their health and well-being.

**Results.** Changes in urine tests were most often found in coronavirus pneumonia of CT-2 severity. Concomitant pathology was detected in 170 of 300 (56.7%) patients with coronavirus pneumonia ( $p < 0.01$ ,  $\chi$ -squared criterion). In the study group the number of patients with concomitant pathology was significantly more frequent (65; 63.1%,  $p < 0.01$ ) compared with patients without concomitant pathology. Most commonly, the patients in the study group had hypertension (34; 33%) ( $p < 0.01$ ,  $\chi$ -squared criterion), diabetes mellitus (14; 13.6%), and obesity (8; 7.8%). A similar pattern was observed in the comparison group. Concomitant pathology was significantly more frequent in patients with elevated serum creatinine values, 42 (24.7%) and 20 (15.4%) ( $p < 0.05$ ,  $\chi$ -squared criterion). The remaining indicators did not differ significantly. The presence of changes in urinary tests was accompanied by significant proteinuria and leukocyturia in groups both with and without concomitant pathology.

**Conclusion.** Almost 30% of patients with COVID pneumonia complicated by acute kidney disease need further dynamic monitoring after discharge from the hospital and do not receive recommendations for outpatient follow-up by specialists upon discharge.

**Keywords:** coronavirus infection; COVID-19-associated pneumonia; clinical urinalysis; kidney disease; proteinuria; leukocyturia

**For citation:** Aleksandrova S.G., Bychkova L.V., Aleksandrova M.R., Politidis R.R. Outcomes of COVID-19 coronavirus pneumonia with kidney damage. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 49-56. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.49-56

**Author's contribution:** Aleksandrova S.G. – chief researcher: patient recruitment, material processing, statistical analysis, writing a publication; Bychkova L.V. – scientific consultant; editing of the publication; Aleksandrova M.R., Politidis R.R. – assistance in recruiting patients. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** Svetlana G. Aleksandrova, PhD MD, Senior lecturer at the Peoples' Friendship University of Russia, Department of hospital therapy with courses of endocrinology, e-mail: alexandrova-sg@rudn.ru

### Information about the authors:

Aleksandrova S.G., <https://orcid.org/0000-0003-1520-8085>

Bychkova L.V., <https://orcid.org/0009-0001-6242-2255>

Aleksandrova M.R., <https://orcid.org/0000-0002-6801-835X>

Politidis R.R., <https://orcid.org/0000-0002-8627-2845>

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

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

Received: 29.02.2024

Accepted: 25.04.2024

Published: 14.06.2024

## Введение

По данным International Society of Nephrology [1], поражение почек наблюдается при тяжелом течении COVID-19 в 25-50% случаев (проявляется протеинурией и/или гематурией [2, 3]), в 15% случаев может развиваться острое повреждение почек (ОПП). У пациентов, находившихся в критическом состоянии, ОПП отмечалась более чем в 20% слу-

чаев [4, 5]. По данным Н. Rabb [6], ОПП возникала у 5% в общей когорте госпитализированных пациентов и у 50% пациентов отделения реанимации. У пациентов с ОПП на фоне пневмонии COVID-19 отмечены повышенные уровни некоторых маркеров воспаления (С-реактивный белок, прокальцитонин, ферритин, D-димер и др.) по сравнению с пациен-

тами с пневмонией COVID-19 и нормальной функцией почек [3, 7, 8].

Для подтверждения диагноза ОПП при инфекции COVID-19 рекомендуется использовать критерии KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) с уровнем доказательности 1A: определение уровня сывороточного креатинина и диуреза [9].

У пациентов, у которых COVID-19 протекал с ОПП, отмечена более высокая смертность. Так, в условиях стационара смертность была достоверно выше у больных с протеинурией, гематурией, повышенным уровнем сывороточного креатинина и мочевины [9, 10]. Продолжительность ОПП после перенесенной инфекции COVID-19, в том числе пневмонии, до сих пор плохо изучена. Ряд авторов указывают на развитие канальцево-интерстициального фиброза у пациентов после COVID-19 [11], что подтверждается рубцеванием ткани в почках по сравнению с пациентами отделения интенсивной терапии с другой легочной инфекцией (не COVID-19) и контрольной группой и может объяснить развитие хронической болезни почек (ХБП) после перенесенной COVID-19.

В исследовании G. Pei и соавт. сообщается о полном восстановлении функции почек [12]. Однако отдаленные последствия поражения почек у пациентов, выживших после перенесенной инфекции COVID-19, неизвестны, что обусловило актуальность нашей работы.

**Цель исследования:** оценить исходы коронавирусной пневмонии COVID-19 с поражением почек у пациентов в зависимости от наличия сопутствующей патологии в динамике.

### Методика

Проведено ретроспективное исследование пациентов, переболевших пневмонией, ассоциированной с COVID-19, в марте 2020 г. – апреле 2021 г., находившихся на лечении в ГБУЗ МО «НФОБ» и ГКБ № 24. Всего было включено методом случайной выборки 300 историй болезней больных в возрасте старше 18 лет без летальных исходов, не имевших в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы (протокол № 30 заседания Комитета по Этике Медицинского института РУДН от 17 июня 2021 г.).

В стационаре пациентам проводились следующие лабораторно-инструментальные исследования: клинический анализ крови (ОАК), биохимический анализ крови, общий анализ мочи (ОАМ), коагулограмма, компьютерная томография легких (КТ), выявление вируса COVID-19 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в мазках из ротоглотки и носоглотки.

Из 300 оцененных историй болезней в 103 (34,3%) были выявлены те или иные изменения в анализах мочи, данные больные составили исследуемую группу по сравнению с пациентами, не имеющими изменений в анализах мочи (группа сравнения).

Пациентов исследуемой группы с изменениями в анализах мочи, через 6-7 месяцев после выписки из стационара обзванивали и уточняли состояние здоровья и самочувствие.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на основе методов вариационной статистики с применением параметрических и непараметрических критериев, используя пакет компьютерных программ Word 98, Excel 98, Access 2000, Statgraf. Числовые данные представлены в абсолютных цифрах и процентах.

Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента, нормальность распределения – по критерию Шапиро–Уилки. Для сравнения групп по частоте качественных переменных использовали критерий  $\chi$ -квадрат.

### Результаты

В нашем исследовании ранее мы уже публиковали результаты обследования пациентов, полученные на момент госпитализации [13, 14]: достоверно наиболее часто изменения в анализах мочи установлены у пациентов при коронавирусной пневмонии средней степени тяжести (КТ-2). В каждой группе пациентов с коронавирусной пневмонией различной степени тяжести и изменениями в ОАМ достоверно превалировала протеинурия, значительно реже выявлялась лейкоцитурия, гематурии не выявлено, уровень Д-димера напрямую зависел от степени поражения легких (чем выше поражение, тем выше значение Д-димера), что позволило заключить, что осложнения со стороны мочевыделительной системы были связаны, в первую очередь, с повреждением клубочков (микротромбоз) и значительно реже – канальцев.

Полученные нами данные соответствуют ранее опубликованным [10, 15, 16]. Так, ОПП развивается у трети больных (28,9%) в исследовании, включавшем 1280 госпитализированных пациентов с COVID-19. При этом чаще всего выявляется протеинурия от 0,3 до 3 г/л (648 пациентов – 50,6%), значительно реже гематурия (77 человек – 6,0%) и лейкоцитурия (282 – 22,0%) [15].

По данным разных авторов, к заболеваниям почек при COVID-19 приводит наличие у пациента следующих факторов риска: хроническая патология почек, прием нефротоксичных лекарственных средств,

наличие сердечно-сосудистой патологии, сердечной недостаточности, иммунодефицитных состояний, сахарного диабета (СД), гипертонической болезни (ГБ), ожирения, атеросклероза, а также пожилой возраст. Они относятся не только к факторам риска инфицирования SARS-CoV-2, но и осложнения клинического течения с ухудшением исходов заболевания [16-19].

Мы оценили частоту выявления сопутствующей патологии у наших больных (табл. 1).

Получили, что у большей части из 300 больных с коронавирусной пневмонией была выявлена сопутствующая патология – 170 пациентов (56,7%) ( $p < 0,01$ ), достоверно чаще в исследуемой группе – 65 (63,1%) ( $p < 0,01$ ) при сравнении с пациентами без изменений в анализах мочи. Наиболее часто у пациентов исследуемой группы выявлялись ГБ – 34 (33%) ( $p < 0,01$ ), СД – 14 (13,6%) и ожирение – 8 (7,8%), в группе сравнения

наблюдалась подобная картина: 41 (20,8%) ( $p < 0,01$ ), СД – 14 (7,1%) и ожирение – 14 (7,1%).

Учитывая полученные данные по достоверно более частому выявлению в исследуемой группе сопутствующей патологии, мы разделили всех больных ( $n=300$ ) для анализа на группы в зависимости от степени тяжести пневмонии по КТ и на подгруппы в зависимости от наличия сопутствующей патологии (подгруппа 1 – есть сопутствующая патология, подгруппа 2 – нет) (табл. 2).

Установлено, что в группе пациентов с коронавирусной пневмонией легкой степени течения (КТ-1) в первой подгруппе (10 (52,6%) пациентов) у 3 больных в анамнезе был СД, у 5 – ГБ и у 2 – сочетание СД и ГБ. У 9 (90%) пациентов этой подгруппы выявлена протеинурия от 0,3 до 1,210 г/л. Во второй подгруппе находилось 9 пациентов (47,4%). У 8 пациентов из этой подгруппы протеинурия находилась в пределах от 0,270

Таблица 1/ Table 1

**Частота выявления сопутствующих заболеваний у пациентов с коронавирусной пневмонией, абс.**  
**The frequency of detection of concomitant diseases in patients with coronavirus pneumonia, abs.**

Сопутствующие Заболевания	Исследуемая группа ( $n=103$ )	Группа сравнения ( $n=197$ )	Всего
ГБ	34*	41*	75*
СД	14	14	28
Ишемическая болезнь сердца (ИБС). Стенокардия	0	5	5
ИБС. Постинфарктный кардиосклероз (ПИКС)	0	4	4
Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)	1	4	5
Бронхиальная астма	1	2	3
Хронический бронхит	1	0	1
Желчнокаменная болезнь	0	4	4
Хронический панкреатит	1	0	1
Хронический гастрит	2	0	2
Язвенная болезнь желудка	1	4	5
Гипотиреоз	1	4	5
Ожирение	8	14	22
Анемия	0	3	3
Онкозаболевания	1	4	5
Ревматоидный артрит	0	2	2
Всего с патологией	65°	105	170°
Без сопутствующей патологии	38	92	130

**Примечание.** \* $p < 0,01$  – критерий  $\chi$ -квадрат при сравнении данных внутри группы (в столбце); °  $p < 0,01$  – критерий  $\chi$ -квадрат при сравнении с числом без сопутствующей патологии.

**Note.** \* $p < 0.01$  is the  $\chi$ -square criterion when comparing data within a group (in a column); °  $p < 0.01$  is the  $\chi$ -square criterion when comparing with a number without concomitant pathology.

до 1,710 г/л, при этом частота выявления протеинурии у пациентов первой и второй подгруппы достоверно не имела различий: 90 и 88,9% соответственно ( $p>0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат). У 1 пациента выраженных изменений в анализах мочи не было. По 1 пациенту в каждой подгруппе имели умеренную лейкоцитирию, гематурии не было.

В группе пациентов с коронавирусной пневмонией умеренной степени течения (КТ-2) в первой подгруппе из 23 (40,4%) пациентов в анамнезе у 3 был СД, у 15 – ГБ, у 5 – сочетание СД и ГБ. У 18 (78,3%) пациентов этой подгруппы выявлена протеинурия от 0,2 до 1,960 г/л. Умеренная лейкоцитирия отмечалась у 4 (17,4%) пациентов, у 1 (4,3%) пациента значимых изменений в анализах мочи не отмечалось. Во второй подгруппе находились 34 (59,6%) пациента, у 30 (88,2%) из них выявлена протеинурия в пределах 0,2 до 1,970 г/л. Умеренная лейкоцитирия отмечалась у 2 (5,9%) пациентов. У 2 (5,9%) пациентов изменений в анализах мочи не отмечалось.

Таким образом, протеинурия у пациентов и первой и второй подгруппы выявлялась достоверно чаще (78,3 и 88,2% пациентов соответственно), чем лейкоцитирия (17,4 и 5,9% больных соответственно) ( $p<0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат, в обоих случаях). Однако различия между подгруппами по частоте выявления различных изменений в ОАМ не было получено.

В группе пациентов с коронавирусной пневмонией среднетяжелой степени течения (КТ-3) в первую подгруппу вошли 4 (26,7%) пациента с ГБ, 3 – с СД в анамнезе, 1 – с сочетанием СД и ГБ. У 3 (75%) пациентов этой подгруппы выявлена протеинурия в пределах от 0,5 до 3,6 г/л. У 1 пациента выявлена умеренная лейкоцитирия. Во второй подгруппе находились 11 (73,3%) пациентов, у всех выявлена протеинурия от 0,3 до 4,25 г/л. Значимой лейкоцитирии более 10 в поле зрения не отмечалась ни у одного больного, средние значения также соответствовали норме в обеих подгруппах без гендерной разницы.

В первую подгруппу пациентов с коронавирусной пневмонией тяжелой степени течения КТ-4 вошли 3 (25%) пациентов с сопутствующей ГБ. У всех пациентов данной подгруппы в анализах мочи обнаружена протеинурия в пределах от 0,32 до 1,500 г/л. Во второй подгруппе находилось 9 (75%) пациентов, у 8 из них протеинурия находилась в пределах 0,3 до 1,620 г/л, у 1 пациента (11,1%) выраженных изменений в анализах мочи не было. Достоверной разницы по частоте выявления изменений в анализе мочи между подгруппами не было ( $p>0,05$ ) (табл. 2).

### Обсуждение

Установлено, что сопутствующая патология в нашем исследовании достоверно чаще встречалась у па-

Таблица 2/ Table 2

**Характеристики подгрупп пациентов при распределении их по наличию сопутствующей патологии и по факту наличию/отсутствию изменений в анализах мочи, абс.**

**Characteristics of the subgroups of patients in their distribution by the presence of concomitant pathology and by the presence/absence of changes in urine tests, abs.**

Показатель	Подгруппа 1 (соп. патология +, n=170)		Подгруппа 2 (без соп. пат., n=130)		P
	подгруппа 1-1 (патология почек +, n= 65)	подгруппа 1-2 (без патологии почек, n=105)	подгруппа 2-1 (патология почек +, n=38)	подгруппа 2-2 (без патологии почек, n=92)	
Протеинурия	59 **	0	34 **	0	$p>0,05$
Лейкоцитирия	6 ×	0	4 ×	0	$p>0,05$
Д-димер повышен	34	43	31 ×	54	$p<0,05$
Тромбоцитопения	5	10	4	17	$p=0,053$
Женский пол	25	48	21 ×	24	$p>0,05$
Мужской пол	40 °	57	17	68 ×	$p>0,05$
Креатинин повышен	10	32 ×	4	16	$p<0,05$

**Примечание.** \* –  $p<0,001$ , критерий  $\chi$ -квадрат при сравнении между подгруппами 1.1. – 1.2. и 2.1. – 2.2; × –  $p<0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат при сравнении между подгруппами 1.1. – 1.2. и 2.1. – 2.2; ° –  $p<0,05$ , критерий хи-квадрат при сравнении по полу внутри подгруппы.

**Note.** \* –  $p<0,001$ ,  $\chi$ -square criterion when comparing between subgroups 1.1. – 1.2. and 2.1. – 2.2; × –  $p<0,05$ ,  $\chi$ -square criterion when comparing between subgroups 1.1. – 1.2. and 2.1. – 2.2; ° –  $p<0,05$ , chi-square criterion when comparing by gender within the subgroup.

циентов с повышенными значениями креатинина в сыворотке крови – 42 (24,7%) и 20 (15,4%) в исследуемой и группе сравнения соответственно ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат), а остальные показатели не имели достоверной разницы, что может быть связано с большим числом лекарственных препаратов, которые получают больные с сопутствующей патологией или вообще не имеют отношения к состоянию почек, а повышаться вследствие другой патологии – сердечной недостаточности и т.д. [20]. Так, Е.М. Евсиков и соавт. [21] описывают у больных COVID-19 разных возрастных групп (молочее и старше 60 лет) различный преморбидный фон почечных заболеваний, при этом по анамнестическим данным на догоспитальном этапе существенных различий между группами по этой патологии не было. Так, в группе более возрастных больных в 4 раза чаще, чем у более молодых диагностировались признаки ХБП III-IV стадии. Единственным объяснением установленно-го различия по частоте ХБП может быть более высокая заболеваемость больных 2-й группы (старше 60 лет) ГБ (симптоматические гипертензии) с развитием в ее исходе гипертонического нефросклероза [21].

Когда мы разбили группы с сопутствующей патологией и без таковой на подгруппы в зависимости от наличия/отсутствия изменений в анализах мочи (табл. 2 подгруппы 1-1, 1-2 и 2-1, 2-2), то выяснилось, что в обоих случаях достоверно чаще наличие изменений в анализах мочи сопровождалось выявлением протеинурии – 59 (90,8%) и 34 (89,5%) случаев в подгруппах ( $p < 0,001$ , критерий  $\chi$ -квадрат в обоих случаях) и лейкоцитурией – 6 (9,2%) и 4 (10, 5%) ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат в обоих случаях). Это указывает на то, что изменения в анализах мочи не связаны напрямую с сопутствующей патологией, а являются проявлением основного заболевания (пневмонии, ассоциированной с коронавирусной инфекцией COVID-19), которые в подгруппе 1-1 (наличие сопутствующей патологии и изменений в анализах мочи) достоверно чаще выявлялись у лиц мужского пола, чем женского – 40 (61,5%) и 25 (38,5%) ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат). В подгруппе 2-1 (изменения в анализах мочи без сопутствующей патологии) достоверно чаще, чем в подгруппе 2-2 выявлялись лица женского пола – 21 (61,8%) и 24 (26,1%) соответственно ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат) и повышенные значения Д-димера в сыворотке крови – 31 (81,6%) и 54 (58,7%) случая соответственно ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат).

По результатам анализа данных выписных эпикризов пациентов ни в одном из них у пациентов с протеинурией не было рекомендовано посещение нефролога или сдача ОАМ в амбулаторных условиях.

Катамнестическое исследование состояния пациентов проведено нами через 6-7 мес. Из 103 больных с поражением почек на фоне COVID-19-пневмонии опрошены по телефону 91 пациент (8 отказались от беседы, 4 не ответили на неоднократные телефонные звонки).

Установлено, что 12 (13,2%) пациентов наблюдались у терапевта или уролога в связи с изменениями в анализах мочи: протеинурия – у 9, лейкоцитурия – у 3. У 7 (7,7%) пациентов амбулаторно был проведен контрольный анализ мочи и крови (клинический и биохимический), патологии не выявлено. Жалоб на самочувствие никто из этих 19 пациентов не предъявлял. 72 (79,1%) больных анализы мочи и крови (клинический и биохимический) после выписки из стационара не сдавали, но у 15 (16,4%) из них имеются отеки, по поводу которых они за врачебной помощью не обращались.

Таким образом, практически треть пациентов (27-29,7%) с ковидной пневмонией, осложненной ОПП, после выписки из стационара нуждались в дальнейшем динамическом наблюдении, однако больше половины из них через полгода после выписки под наблюдением не находились и контрольные анализы не сдавали. И это при том, что специалисты во всех публикациях пациентам, у которых были выявлены нарушения работы почек при COVID-19, рекомендуют контролировать нефрологическую безопасность всех назначаемых лекарственных средств и через 3-12 месяцев после выздоровления сдать контрольные анализы [12, 22, 23]. Пациентам, которые проходили лечение дома, тоже рекомендуется после перенесенного COVID-19 сдать ОАМ и ОАК, биохимический анализ крови и уровень креатинина.

### Заключение

Сопутствующая патология в нашем случае достоверно чаще встречалась у пациентов с повышенными значениями креатинина в сыворотке крови – 42 (24,7%) и 20 (15,4%) ( $p < 0,05$ , критерий  $\chi$ -квадрат), остальные показатели не имели достоверной разницы. Наличие изменений в анализах мочи сопровождалось достоверным выявлением протеинурии и лейкоцитурии в группах как с наличием сопутствующей патологии, так и без таковой и доказывает, что изменения в анализах мочи не связаны напрямую с сопутствующей патологией, а являются проявлением основного заболевания (пневмонии, ассоциированной с коронавирусной инфекцией COVID-19).

Практически 30% пациентов с ковидной пневмонией, осложненной ОПП, после выписки из стационара нуждаются в дальнейшем динамическом наблюде-

нии и не получают при выписке рекомендаций по наблюдению специалистами.

По нашим данным, в группу риска по развитию осложнений со стороны мочевыводящей системы при ковидной пневмонии следует включать пациентов с протеинурией в возрасте от 45 до 74 лет, мужского пола с наличием сопутствующей патологии (АГ, ГБ, ожирение) при умеренной степени течения коронавирусной пневмонии и при повышении Д-димера в сыворотке крови. Данные пациенты нуждаются в амбулаторном наблюдении после выписки из стационара.

### Литература

(п.п. 1-12; 16; 17; 20; 23 см. References)

13. Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Ляпунова Т.В., Родоман М.Г. Изменения в анализах мочи и показателях функции почек у пациентов с вирусной пневмонией COVID-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(3): 69-79. <https://doi.org/10.25557/0031-299120220369-79>
14. Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Орлова А.М. Клинико-лабораторные особенности пациентов с коронавирусной пневмонией COVID-19 и изменениями в общем анализе мочи. *Вестник НМХЦ им. Н.И. Пирогова*. 2022; 17(4-2): 69-74. [https://doi.org/10.25881/20728255\\_2022\\_17\\_4\\_2\\_69](https://doi.org/10.25881/20728255_2022_17_4_2_69)
15. Чеботарева Н.В., Бернс С.А., Мясников А.Л., Андросова Т.В., Бернс А.С., Лобзов Б.Б. и др. Частота, факторы риска и прогностическое значение острого повреждения почек у госпитализированных больных с COVID-19: ретроспективное когортное исследование. *Клиническая фармакология и терапия*. 2021; 30(1): 30-5.
16. Бойцов С.А., Погосова Н.В., Палеев Ф.Н., Ежов М.В., Комаров А.Л., Певзнер Д.В. и др. Клиническая картина и факторы, ассоциированные с неблагоприятными исходами у госпитализированных пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Кардиология*. 2021; 61(2): 4-14. <https://doi.org/10.18087/cardio.2021.2.n1532>
17. Выхристенко Л.Р., Счастливленко А.И., Бондарева Л.И., Сидоренко Е.В., Музыка О.Г. Поражение почек при инфекции COVID-19. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2021; 20(1): 7-23. <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2021.1.7>
18. Евсиков Е.М., Гордеев И.Г., Вечорко В.И., Байкова О.А., Артамонова Н.Г. Изменения функции почек и преморбидный нефрологический анамнез у больных COVID-19, осложненным пневмонией. *Профилактическая медицина*. 2020; 23(7): 37-42. <https://doi.org/10.17116/profmed20202307137>
19. Нагибович О.А., Захаров М.В., Шелухин В.А., Аксенов В.В., Шипилова Д.А. Поражение почек при новой коронавирусной инфекции. *Вестник терапевта*. 2021; 4(51). URL: <https://therapyedu.ru/statyi/porazhenie-pochek-pri-novoj-koronavirusnoj-infekcii> (дата обращения: 20.02.2023)
20. Mohamed M.M.B., Lukitsch I., Torres-Ortiz A.E., Walker J.B., Varghese V., Hernandez-Arroyo C.F., et al. Acute kidney injury associated with coronavirus disease 2019 in urban New Orleans. *Kidney360*. 2020; 1(7): 614-22. <https://doi.org/10.34067/KID.0002652020>
21. Husain-Syed F., Wilhelm J., Kassoumeh S., Birk H.-W., Herold S., Vadász I., et al. Acute kidney injury and urinary biomarkers in hospitalized patients with coronavirus disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2020; 35(7): 1271-4. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa162>
22. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*. 2020; 323(20): 2052-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
23. Fanelli V., Fiorentino M., Cantaluppi V., Gesualdo L., Stallone G., Ronco C., Castellano G. Acute kidney injury in SARS-CoV-2 infected patients. *Crit Care*. 2020; 24(1): 155. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02872-z>
24. Rabb H. Kidney diseases in the time of COVID-19: major challenges to patient care. *J Clin Invest*. 2020; 130(6): 2749-51. <https://doi.org/10.1172/JCI138871>
25. Hirsch J.S., Ng J.H., Ross D.W., Sharma P., Shah H.H., Barnett R.L., et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020 Jul; 98(1): 209-18. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.05.006>
26. Li Z., Wu M., Yao J., Guo J., Liao X., Song S., et al. Caution on Kidney Dysfunctions of COVID-19 Patients. *medRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.08.20021212>
27. Kellum J.A., Lameire N., Aspelin P., Barsoum R.S., Burdman E.A., Goldstein S.L., et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney International Supplements*. 2012; 2(1): 1-138. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.1>
28. Cheng Y., Luo R., Wang K., Zhang M., Wang Z., Dong L., et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int*. 2020; 97(5): 829-38. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.03.005>
29. Jansen J., Reimer K.C., Nagai J.S., Varghese F.S., Overheul G.J., de Beer M., et al. SARS-CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids. *Cell Stem Cell*. 2022; 3; 29(2): 217-31. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.12.010>
30. Pei G., Zhang Z., Peng J., Liu L., Zhang C., Yu C., et al. Renal involvement and early prognosis in patients with COVID-19 pneumonia. *J Am Soc Nephrol*. 2020; 31(6): 1157-65. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020030276>
31. Aleksandrova S.G., Bychkova L.V., Aleksandrova M.R., Lyapunova T.V., Podoman M.G. Changes in urine tests and renal function indices in patients with COVID-19 viral pneumonia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2022; 66(3): 69-79 <https://doi.org/10.25557/0031-299120220369-79> (in Russian)
32. Aleksandrova S.G., Bychkova L.V., Aleksandrova M.R., Orlova A.M. Clinical and laboratory features of patients with COVID-19 coronavirus pneumonia and changes in the general urine analysis. *Vestnik NMHC im. N.I. Pirogova*. 2022; 17(4-2): 69-74. [https://doi.org/10.25881/20728255\\_2022\\_17\\_4\\_2\\_69](https://doi.org/10.25881/20728255_2022_17_4_2_69) (in Russian)
33. Chebotareva N.V., Berns S.A., Myasnikov A.L., Androsova T.V., Berns A.S., Lobzov B.B., et al. Prevalence, risk factors and prognostic significance of acute renal injury in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2021; 30(1): 30-5. (in Russian)

### References

1. *International Society of Nephrology (ISN) [Electronic resource]*. Mode of access: <https://www.theisn.org/covid-19>. Date of access: 22.01.2021



16. Nasr S.H., Alexander M.P., Cornell L.D., Herrera L.H., Fidler M.E., Said S.M., et al. Kidney biopsy findings in patients with COVID-19, kidney injury, and proteinuria. *Am J Kidney Dis.* 2021; 77(3): 465–8. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.11.002>
17. Ahmed A.R., Ebad C.A., Stoneman S., Satti M.M., Conlon P.J. Kidney injury in COVID-19. *World J Nephrol.* 2020; 9(2): 18-32. <https://doi.org/10.5527/wjn.v9.i2.18>
18. Boytsov S.A., Pogosova N.V., Paleev F.N., Ezhov M.V., Komarov A.L., Pevsner D.V., et al. Clinical characteristics and factors associated with poor outcomes in hospitalized patients with novel coronavirus infection COVID-19. *Kardiologiya.* 2021; 61(2): 4-14. <https://doi.org/10.18087/cardio.2021.2.n1532> (in Russian)
19. Vyhristenko L.R., Schastlivenko A.I., Bondareva L.I., Sidorenko E.V., Muzyka O.G. Kidney damage in COVID-19 infection. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2021; 20(1): 7-23. <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2021.1.7> (in Russian)
20. Fuchs T.C., Hewitt P. Biomarkers for drug-induced damage and nephrotoxicity. An overview for applied toxicology. *AAPS J.* 2011; 13(4): 615-31. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9301-x>
21. Evsikov E.M., Gordeev I.G., Vechorko V.I., Baikova O.A., Artamonova N.G. Changes in kidney function and premorbid nephrologic anamnesis in patients with COVID-19, complicated by pneumonia. *Profilakticheskaya meditsina.* 2020; 23(7): 37–42. <https://doi.org/10.17116/profmed20202307137> (in Russian)
22. Nagibovich O.A., Zaharov M.V., Sheluhin V.A., Aksenov V.V., Shipilova D.A. Kidney damage in a new coronavirus infection. *Vestnik terapevta.* 2021; 4(51). URL: <https://therapyedu.ru/statyi/porazhenie-pochek-pri-novoj-koronavirusnoj-infekcii/> (Retrieved: 20.02.2023). (in Russian)
23. Piñeiro G.J., Molina-Andújar A., Hermida E., Blasco M., Quintana L.F., Rojas G.M., et al. Severe acute kidney injury in critically ill COVID-19 patients. *J Nephrol.* 2021; 34(2): 285-93. <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00918-7>

**Сведения об авторах:**

**Александрова Светлана Григорьевна**, ассистент каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: alexandrova-sg@rudn.ru;

**Бычкова Лариса Владимировна**, канд. мед. наук, доцент, каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: lvb57@bk.ru;

**Александрова Марина Робертовна**, канд. мед. наук, доцент, каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: alexandrova-mr@rudn.ru;

**Политидис Рита Романовна**, канд. мед. наук, доцент каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: politidis-rr@rudn.ru

Иванов А.Н., Сахань М.А., Ермаков А.В., Савкина А.А., Степанова Т.В., Никитина В.В., Ленгерт Е.В., Кириязи Т.С.

## Влияние полилактидных раневых покрытий на редокс-статус при механической травме кожи у крыс

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, 410012, Саратов, Россия, ул. Большая Казачья, д. 112

**Введение.** Свободнорадикальные процессы являются неотъемлемой частью заживления ран, с одной стороны оказывая альтерирующее действие на собственные ткани, и с другой являясь важными регуляторами репаративных процессов. Использование адресной доставки прооксидантов и антиоксидантов в лечении ран открывает новые перспективы для улучшения исходов регенерации. В этой связи **целью** настоящего исследования явилось изучение влияния микрокамерных полилактидных раневых покрытий, обеспечивающих адресную доставку про- и антиоксидантных компонентов, на состояние ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты у крыс с послойным эксцизионным дефектом кожи.

**Методика.** Исследование проведено на 81 белой крысе, разделенных на пять групп: контрольную ( $n=9$ ), сравнительную ( $n=18$ ), три опытные (по  $n=18$ ). У животных сравнительной и опытных групп оперативным путем создавалась модель кожной раны размером 10×10 мм. Животным опытной группы № 1 дефект закрывался полилактидным микрокамерным раневым покрытием без активных компонентов. Крысам опытных групп №2 и 3 накладывалось аналогичное покрытие, микрокамеры которого были загружены таниновой кислотой и перкарбонатом натрия соответственно. Оценивались активность супероксиддисмутазы и каталазы, а так же концентрация тиоловых групп в сыворотке крови.

**Результаты.** Повреждение кожи вызывает изменения ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты, что проявляется увеличением активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также снижением тиолового статуса у крыс группы сравнения. Применение микрокамерного раневого покрытия, загруженного таниновой кислотой, частично восстанавливает концентрацию тиоловых групп и активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови. Применение микрокамерного раневого покрытия с перкарбонатом натрия способствует частичному снижению активности супероксиддисмутазы, относительно группы сравнения, а так же повышению концентрации тиоловых групп в сыворотке крови на поздних этапах репаративного процесса, но при этом практически не оказывает влияние на активность каталазы.

**Выводы:** Таким образом, загрузка про- и антиоксидантных компонентов в микрокамерное полилактидное покрытие позволяет корректировать изменения тиолового статуса, активности супероксиддисмутазы и каталазы у крыс послойным дефектом кожи.

**Ключевые слова:** раневые покрытия; послойный дефект кожи; таниновая кислота; перкарбонат натрия; антиоксиданты; полилактид

**Для цитирования:** Иванов А.Н., Сахань М.А., Ермаков А.В., Савкина А.А., Степанова Т.В., Никитина В.В., Ленгерт Е.В., Кириязи Т.С. Влияние полилактидных раневых покрытий на редокс-статус при механической травме кожи у крыс.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(2): 57-67.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.2.57-67

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Иванов А.Н., Ермаков А.В.; сбор и обработка материала – Савкина А.А., Никитина В.В., Ленгерт Е.В., Степанова Т.В.; статистическая обработка материала – Кириязи Т.С., Сахань М.А.; написание текста – Сахань М.А., Иванов А.Н.; редактирование – Иванов А.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Сахань Максим Алексеевич, e-mail: maksimsahan425@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка микрокамерных раневых покрытий, обеспечивающих локальную модуляцию оксидативного гомеостаза тканей» (№ 122031600259-9).

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

Поступила 13.02.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

Ivanov A.N., Sahan M.A., Ermakov A.V., Savkina A.A., Stepanova T.V., Nikitina V.V., Lengert E.V., Kiriyaži T.S.  
**The effect of polylactide wound dressings on redox status during mechanical trauma to the skin of rats**

V.I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,  
112 Bolshaya Kazachya str., 410012, Saratov, Russian Federation

**Introduction.** Free-radical processes are an integral part of wound healing. On one hand, they have an altering effect on tissues, and on the other hand, they are important regulators of reparative processes. The targeted delivery of pro- and antioxidants in wound treatment opens new prospects for improving regeneration outcomes. Thus, **the aim** of this study was to investigate the effect of microchamber polylactide wound dressings that provide targeted delivery of pro- and antioxidant components on enzymatic and non-enzymatic elements of antioxidant protection in rats with full-thickness skin surgical wounds.

**Methods.** The study was carried out on 81 male white rats divided into five groups: normal, control group ( $n=9$ ), comparison group with untreated wound ( $n=18$ ), and three experimental, treated groups ( $n=18$  each). In animals of the comparison and experimental groups, a skin wound  $10 \times 10$  mm was surgically created. In experimental group 1, a polylactide microchamber wound dressing without active components was applied to the formed skin defect. In experimental groups 2 and 3, a similar dressing was applied, in which the microchambers were loaded with tannic acid and sodium percarbonate, respectively. The activities of superoxide dismutase and catalase and the serum concentration of total thiol groups were assessed.

**Results.** In rats of the comparison group, skin damage caused changes in the enzymatic and non-enzymatic components of antioxidant protection that are manifested by an increase in the activity of superoxide dismutase and catalase and a decrease in thiol status. The use of a microchamber wound dressing saturated with tannic acid partially restored the concentration of thiol groups and the activity of superoxide dismutase and catalase in the blood serum. The use of microchamber wound dressing with sodium percarbonate produced a partial decrease in the activity of superoxide dismutase compared to the comparison group and an increase in thiol groups at the later stages of the reparative process, but had virtually no effect on the activity of catalase.

**Conclusion:** Thus, loading pro- and antioxidant components into a microchamber polylactide coating makes it possible to correct changes in thiol status and superoxide dismutase and catalase activities in a full-thickness skin wound.

**Keywords:** wound dressings; wound defect of the skin; tannic acid; sodium percarbonate; antioxidants; polylactic acid

**For citation:** Ivanov A.N., Sahan M.A., Ermakov A.V., Savkina A.A., Stepanova T.V., Nikitina V.V., Lengert E.V., Kiriyaži T.S. The effect of polylactide wound dressings on redox status during mechanical trauma to the skin of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 57-67. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.57-67

**Author's contribution:** The concept and design of the study – Ivanov A.N., Ermakov A.V.; collection and processing of material – Savkina A.A., Nikitina V.V., Lengert E.V., Stepanova T.V.; statistical processing of the material – Kiriyaži T.S., Sahan M.A.; writing the text – Sahan M.A., Ivanov A.N.; editing the text – Ivanov A.N. Approval of the final version of the article – all authors.

**For correspondence:** Maksim A. Sahan, Assistant of the Department of Physiology named after I.A. Chuevsky of the SSMU named after V.I. Razumovsky, e-mail: maksimsahan425@gmail.com

**Information about authors:**

Ivanov A.N., <https://orcid.org/0000-0003-4061-5221>  
Sahan M.A., <https://orcid.org/0009-0004-3909-657X>  
Ermakov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8105-5932>  
Savkina A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2357-400X>  
Stepanova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-8439-8033>  
Nikitina V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8893-8612>  
Lengert E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6447-2811>  
Kiriyaži T.S., <https://orcid.org/0000-0003-1180-5560>

**Financing.** The study was performed within the framework of the state assignment of the Saratov State Medical University named after Razumovsky of the Ministry of Health of Russia (Grant № 122031600259-9).

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

Received 13.02.2024  
Accepted 25.04.2024  
Published 14.06.2024

## Введение

Согласно отчету Федеральной службы государственной статистики за 2022 г. зарегистрировано 230 428 случаев травм, связанных с повреждением

кожного покрова. На лечение ран различного характера приходится в среднем от 3 до 6% от бюджета здравоохранения [1]. В связи с этим остро стоит проблема

поиска эффективных средств лечения кожных ран. В настоящее время, в рамках комплексного подхода к лечению ран активно используются различные раневые покрытия. Эволюция раневых покрытий включала несколько этапов. Изначально применялись традиционные материалы (вата, марля, пластыри). Их применение позволяло ограничить рану от внешней среды, способствовало остановке кровотечения. Но в то же время имелся ряд недостатков их использования: травматизация при смене повязок, местное раздражение, развитие иммунного ответа с отторжением материала. Следующий этап развития технологии создания раневых покрытий позволил обойти указанные недостатки. Разработан ряд биodeградируемых материалов на основе полигликолида, полиэтиленгликоля, поликапролактона полилактида и др., они не требовали смены повязки, а физико-химические свойства позволили резко снизить риск иммунного ответа [2].

Дальнейшее развитие технологий привело к появлению многообразия раневых покрытий, в связи с этим в настоящее время требования к ним резко возросли. Основные требования к современным раневым покрытиям: пластичность (возможность моделирования структуры для плотного прилегания к ране), атравматичность во время ношения и перевязках, биосовместимость (низкая токсичность, низкая антигенная активность), газопроницаемость, защита (механическая и противомикробная), дешевизна производства, удобство применения (легкость наложения, биоразлагаемость) [2].

Принимая во внимание сказанное, выгодно отличаются среди прочих биodeградируемые раневые покрытия на основе полимера молочной кислоты (полилактида), которые в полной мере соответствуют указанным требованиям Отечественными и зарубежными авторами показано, что применение полилактидных раневых покрытий способствует значительному ускорению заживления ран [3, 4]. Следующий этап эволюции технологий создания раневых покрытий открыли методы микро- и наноструктурирования перевязочных материалов. Так показана возможность изменения структурной организации биodeградируемых покрытий на основе полилактида с включением в его микроархитектонику микрокамер. Микрокамеры могут быть использованы в качестве ёмкостей для адресной доставки различных биологически активных веществ, влияющих на течение раневого процесса [5].

Выделяют три фазы течения раневого процесса (фаза воспаления, фаза пролиферации и фаза ремоделирования), длительность которых и определяет общий срок заживления раны [6]. Скорость сменяемости фаз

напрямую зависит от силы и продолжительности действия альтерирующих факторов, как первичных, так и вторичных. Среди факторов вторичной альтерации особую роль занимают свободные радикалы, которые образуются на протяжении всего раневого процесса. Чрезмерное образование свободных радикалов способно значительно замедлять заживление раны [7]. В этой связи перспективным видится использование антиоксидантов в качестве наполнителя микрокамер в полилактидном раневом покрытии. Из множества веществ, обладающих антиоксидантной активностью, особого внимания заслуживают таниновая кислота, потому что помимо указанного свойства, она также обладает противовоспалительным действием, способствует индукции репаративных процессов, участвует в процессах ремоделирования [8].

В то же время, данные литературы указывают, что для улучшения исходов репаративных процессов при заживлении кожных ран могут быть применены компоненты, обладающие прооксидантным эффектом. Так, широко используемый в качестве антисептического средства пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) является важной регуляторной молекулой, которая обеспечивает остановку кровотечения, индукцию воспалительного процесса, стимулирует миграцию кератиноцитов, пролиферацию фибробластов, а также ангиогенез, необходимый для восстановления адекватной трофики в зоне раневого дефекта. Пиковое увеличение концентрации активных форм кислорода в тканях при обработке раны растворами  $H_2O_2$ , оказывает бактерицидный эффект за счет его окислительных свойств, но может оказывать альтерирующее действие на собственные клетки организма, что неблагоприятно для протекания репаративных процессов [9]. Вместе с тем  $H_2O_2$  является нестабильным соединением, что позволяет применять его только в пиковых концентрациях. В этой связи актуальны исследования возможностей использования в ране пролонгируемого контролируемого релиза  $H_2O_2$  из более стабильных соединений, таких как перкарбонат натрия.

Совокупность данных литературы свидетельствует, что применение про- и антиоксидантных веществ в составе покрытия может оказывать значительное влияние на течение раневого процесса за счет модуляции локального оксидативного гомеостаза и изменения концентрации продукции активных форм кислорода (АФК). Одним из показателей уровня продукции АФК является напряжение антиоксидантной защиты организма, как ее неферментативного звена, так и ряда ферментов, включая супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу. В литературе имеется множество [10-12]

данных, свидетельствующих, что течение раневого процесса сопряжено со сдвигами тиолового гомеостаза и активности СОД и каталазы. В этой связи, значительный интерес представляет изучение влияния покрытий с про- и антиоксидантными свойствами на динамику изменений параметров антиоксидантной системы организма при заживлении ран представляет значительный интерес.

**Цель исследования** — оценить концентрацию маркеров тиолового гомеостаза, а также активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови крыс на фоне острой экспериментальной эксцизионной кожной раны закрытой полилактидным микрокамерным раневым покрытием, загруженным таниновой кислотой или перкарбонатом натрия.

### Методика

Эксперименты проведены на беспородных крысах самцах в возрасте от 6 до 12 мес, массой 180–240 г, разделенных на 5 групп.

В первую группу вошли 9 крыс и составили контроль.

Вторая группа состояла из животных (18 крыс), которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны (группа сравнения).

Третью группу (опытная группа № 1) составили 18 крыс, которым выполнена острая эксцизионная кожная рана и закрыта «пустым» полилактидным микрокамерным раневым покрытием.

В четвертую и пятую группу (опытная группа № 2 и опытная группа № 3) вошло по 18 крыс, которым выполнена острая эксцизионная кожная рана и закрыта полилактидным микрокамерным раневым покрытием, загруженным таниновой кислотой (опытная группа № 2) или перкарбонатом натрия (опытная группа № 3).

Животные содержались в одинаковых условиях. Содержание и уход за животными осуществлялись в соответствии с СанПиНом 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», а так же с ГОСТом 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и «Методическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений» (РД-АПК 3.10.07.02-09). Все экспериментальные животные прошли процедуру хендлинга.

Эксперименты над животными проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сен-

тября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей, с Федеральным законом от 27.12.2018 N 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».

Проведение экспериментов одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУВО «Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского» Минздрава России, что отмечено в протоколе № 12 от 30.06.2022 г.

При проведении хирургических манипуляций, а также при заборе крови животным выполнялась общая анестезия: внутримышечное введение раствора тилетамина и золазепам (Телазол 100 мг®, производитель «Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L.» из расчета 10 мг/кг (0,1 мл/кг) массы тела и ксилазина гидрохлорида (Ксиланит®, производитель ООО «Нита-Фарм», Россия) в дозе 1 мг/кг (0,05 мл/кг) массы тела.

Острая эксцизионная кожная рана формировалась по стандартной методике. Для этого, после выполнения общей анестезии крысу фиксировали вязками на операционном столике в положении на животе. После удаления шерсти в межлопаточной области, кожа обрабатывалась растворами антисептиков. Нанесение разметки будущей раны выполнялось при помощи квадратного трафарета 10×10 мм, края которого обводились 5% раствором йода. По разметке, при помощи скальпеля, пинцета и ножниц, производилось иссечение всей толщи эпидермиса и дермы. Остановка кровотечения выполнялась аппликацией сухим стерильным марлевым тампоном. Затем, непосредственно после операции, на кожный дефект укладывалось раневое покрытие идентичного размера (кроме крыс группы сравнения). Наложение раневого покрытия осуществлялось однократно, непосредственно после формирования кожной раны.

Раневые покрытия представляют собой пластинки, толщиной до 1 мм. В микроархитектонику покрытий включены массивы полимерных микрорезервуаров (микрокамер), которые формировались с применением специально изготовленного шаблона с рельефом в виде лунок микронного размера. Заполнение микрокамер биологически активными веществами производилось на этапе изготовления. Методика производства микрокамерных раневых покрытий подробно описана по ссылке [5].

В качестве биологически активных веществ использовались таниновая кислота или перкарбонат натрия (Sigma Aldrich, США).

Забор крови у животных осуществлялся на 7-е и 14-е сут исследования под общей анестезией. Для этого жи-

вотное укладывали на стол брюшной стороной вверх, иглу вводили в проекции правых отделов сердца. Глубина введения иглы 1-2 см.

Изучение динамики показателей антиоксидантной защиты на ранних стадиях репаративных процессов (в фазу альтерации) не анализировалось, так как в этот момент процессы, связанные с образованием свободных радикалов в большей степени зависят от параметров травматизации тканей, чем от свойств покрытия.

В полученной сыворотке крови оценивали: суммарную активность изоформ фермента супероксиддисмутазы (СОД), активности каталазы, а также концентрацию общих тиоловых групп (SH-групп). С этой целью использовали наборов реагентов CaymanChemicalCompany (США). Анализ оптической плотности выполнен на микропланшетном спектрофотометре StatFax 4200 (Awareness Technology, США).

Для статистической обработки полученных результатов использовали программный пакет «Statistica 10» (StatSoft, США). Большинство данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Для множественных сравнений между группами использовали критерий Краскела–Уоллиса. Для детализации изменений проводилось сравнение результатов попарно между группами с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для сравнений внутри группы, на основании которых рассчитывали показатель достоверности  $p$  с критическим уровнем равным 0,05.

### Результаты

В результате проведенных исследований установлено, что формирование острой эксцизионной кожной раны сопровождается значимыми изменениями активности СОД ( $H=16,8$ ;  $p=0,0002$ ) и каталазы ( $H=17,4$ ;  $p=0,0002$ ), а также тиолового статуса ( $H=20$ ;  $p<0,0001$ ) относительно значений группы контроля.

К 7 дню эксперимента в крови животных, которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны (группа сравнения), происходит двукратное нарастание концентрации антиоксидантных ферментов СОД и каталазы по сравнению с группой контроля. В этот срок происходит статистически значимое снижение на 37,7% медианного значения концентрации общих сульфгидрильных (тиоловых) групп (таблица). Указанные изменения свидетельствуют об активации антиоксидантных систем в организме крыс.

К 14 суткам исследования у животных группы сравнения сохраняется повышенная активность ферментативного звена противooksидантной защиты, но при

этом происходит статистически значимое увеличение концентрации в сыворотке крови общих SH-групп на 18,8% относительно значений 7-х сут эксперимента. Вместе с тем, тиоловый статус у животных группы сравнения на 14-е остается значимо сниженным относительно значений группы контроля на 23% (таблица). Следовательно, формирование острой эксцизионной кожной раны приводит к изменению окислительно-восстановительного гомеостаза, что выражается снижением концентрации SH-групп и стойким повышением активности ферментативного звена.

Результаты исследования, представленные в таблице, свидетельствуют, что, применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия без активных компонентов в опытной группе № 1 не оказывает значимого влияния на изменения окислительно-восстановительных процессов как на 7-е, так и на 14-е сут исследования относительно группы сравнения. Также как и в группе сравнения, у крыс опытной группы № 1 отмечаются значимые изменения активности СОД ( $H=14,1$ ;  $p=0,0009$ ) и каталазы ( $H=15,7$ ;  $p=0,0004$ ), а также тиолового статуса ( $H=19,9$ ;  $p<0,0001$ ) относительно значений группы контроля.

Таким образом, использование микрокамерного полилактидного раневого покрытия, сопровождающееся биodeградацией полилактида в ране, не оказывает альтерирующего воздействия на ткани и не вызывает усиления сдвигов параметров ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной защиты.

Данные таблицы показывают, что в группе крыс, у которых рана была закрыта полилактидным микрокамерным раневым покрытием, загруженным таниновой кислотой (опытная группа № 2) к 7-м суткам исследования происходит статистически значимое нарастание активности антиоксидантных ферментов в сыворотке крови, в частности, СОД на 36,6% и каталазы на 17,4 % по сравнению с группой контроля. Повышение активности СОД и каталазы в сыворотке крови у крыс опытной группы № 2 по сравнению с контролем без существенной динамики сохраняется до 14-х сут эксперимента.

В соответствии с данными таблицы динамика показателя тиолового статуса в опытной группе № 2 свидетельствует, что на 7-е сут эксперимента концентрация общих сульфгидрильных групп статистически значимо снижается относительно контрольной группы на 14,5 %, а к 14-м сут восстанавливается полностью до уровня значений интактных животных. Активность СОД в сыворотке крови у крыс опытной группы №2 на 7-е и 14-е сут эксперимента, ниже, чем в группе сравнения на 40% и 29% соответственно. Активность каталазы в сыворотке крови у крыс опытной груп-

пы №2 на 7-е и 14-е сут эксперимента, также ниже, чем в группе сравнения на 37% и 34% соответственно. При этом концентрация тиоловых соединений в крови у крыс опытной группы № 2 превышает таковую в группе сравнения на 36% на 7-е сут эксперимента и на 25% на 14-е сут после наложения покрытия.

При сравнении показателей антиоксидантной защиты у крыс опытных групп № 1 и № 2 выявлены зна-

чимые отличия активности СОД ( $H=11,2$ ;  $p=0,0106$ ) и каталазы ( $H=18,2$ ;  $p=0,0004$ ), а также тиолового статуса ( $H=17,1$ ;  $p=0,0004$ ). Обнаружено, что наличие таниновой кислоты в составе покрытия на 7-е и 14-е сут снижает активность СОД на 21% и 16%, активность каталазы – на 27% и 24% соответственно. Вместе с тем, концентрация тиоловых соединений в сыворотке крови под влиянием таниновой кислоты в составе ране-

**Показатели звеньев антиоксидантной защиты в области раневого дефекта кожи у крыс разных групп на 7-е и 14-е сут**  
**Indicators of antioxidant defense units in the area of wound skin defect in rats of different groups on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days**

Параметры		СОД, Ед/мл	Каталаза, нмоль/мин/мл	Тиоловый статус, мкмоль/л
Контроль (n=9)		1,1 (0,9; 1,2)	21,3 (16; 21,9)	179 (177; 201)
Группа сравнения	7-е сут (n=9)	2,5 (2; 2,8) $p_1 < 0,001$	40,7 (35,7; 51) $p_1 < 0,001$	112 (75; 118) $p_1 < 0,001$
	14-е сут (n=9)	2,1 (1,9; 2,4) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,269$	36,9 (31,7; 45,8) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,757$	138 (124; 142) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,017$
Опытная группа № 1	14-е сут (n=9)	1,9 (1,6; 2,9) $p_1 < 0,001$ $p_3 = 0,369$	34,6 (29,1; 43,6) $p_1 < 0,001$ $p_3 = 0,270$	129 (106; 140) $p_1 < 0,001$ $p_3 = 0,153$
	7-е сут (n=9)	1,8 (1,7; 2) $p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,540$ $p_3 = 0,133$	32,2 (29,1; 40,7) $p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,513$ $p_3 = 0,122$	145 (139; 148) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,034$ $p_3 = 0,102$
Опытная группа № 2	7-е сут (n=9)	1,5 (1,4; 1,7) $p_1 = 0,011$ $p_3 = 0,001$ $p_4 = 0,011$	25 (24,4; 28) $p_1 = 0,004$ $p_3 = 0,001$ $p_4 = 0,002$	153 (150; 175) $p_1 = 0,008$ $p_3 < 0,001$ $p_4 = 0,006$
	14-е сут (n=9)	1,5 (1,3; 1,7) $p_1 = 0,024$ $p_2 = 0,791$ $p_3 = 0,002$ $p_4 = 0,042$	24,4 (21,5; 25,7) $p_1 = 0,042$ $p_2 = 0,233$ $p_3 < 0,001$ $p_4 = 0,010$	173 (151; 178) $p_1 = 0,102$ $p_2 = 0,401$ $p_3 = 0,002$ $p_4 = 0,010$
Опытная группа № 3	7-е сут (n=9)	1,8 (1,4; 2) $p_1 = 0,004$ $p_3 = 0,013$ $p_4 = 0,253$	36,3 (34,5; 45,1) $p_1 < 0,001$ $p_3 = 0,596$ $p_4 = 0,653$	106 (94; 117) $p_1 < 0,001$ $p_3 = 0,658$ $p_4 = 0,307$
	14-е сут (n=9)	1,6 (1,3; 1,8) $p_1 = 0,010$ $p_2 = 0,223$ $p_3 = 0,009$ $p_4 = 0,185$	30,5 (29,1; 39,2) $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,216$ $p_3 = 0,053$ $p_4 = 0,825$	153 (147; 160) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,002$ $p_3 = 0,027$ $p_4 = 0,233$

**Примечание.** Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

$p_1$  – уровень значимости по сравнению с контролем.

$p_2$  – уровень значимости относительно 7-х сут в той же группе.

$p_3$  – уровень значимости относительно группы сравнения в тот же срок наблюдения.

$p_4$  – уровень значимости относительно раневого покрытия без активных компонентов в тот же срок наблюдения.

**Note.** Data are presented as median, upper and lower quartiles.

$p_1$  – level of significance compared to control.

$p_2$  – level of significance relative to day 7 in the same group.

$p_3$  – level of significance relative to the comparison group at the same observation period.

$p_4$  – level of significance relative to wound coverage without active components at the same observation period.

вого покрытия увеличивается на 19% как на 7-е, так и на 14-е сут эксперимента (см. табл.).

Таким образом, таниновая кислота в составе покрытия уменьшает сдвиги параметров антиоксидантной защиты, характерные для процесса заживления дефекта кожи, препятствуя снижению концентрации тиоловых групп и повышению активности антиоксидантных ферментов.

У животных, рана которых была закрыта раневым покрытием, загруженным перкарбонатом натрия (опытная группа № 3) эксперимента происходит статистически значимые изменения активности антиоксидантных ферментов СОД ( $H=11,2$ ;  $p=0,0037$ ) и каталазы ( $H=15,2$ ;  $p=0,0005$ ), а также тиолового статуса ( $H=20,1$ ;  $p<0,0001$ ) относительно группы контроля. В частности на 7-е сут эксперимента активность СОД увеличивается на 63,6%, а активность каталазы увеличивается на 70,4%. Так же происходит снижение концентрации общих сульфгидрильных групп на 40,8%. Данная тенденция сохраняется до 14-х сут эксперимента без существенной динамики.

Относительно группы сравнения у животных опытной группы № 3 на 7-е сут исследования активность СОД статистически значимо ниже на 28%, при этом достаточно высока активность каталазы, ее активность статистически неотличима от группы сравнения. Концентрация тиоловых групп в сыворотке у крыс опытной группы № 3, также не имеет отличий от таковой в группе сравнения в соответствующий срок наблюдения.

К 14 сут исследования у животных опытной группы № 3 активность СОД ниже значений группы сравнения на 36%. Активность каталазы при этом остается высокой, и статистически не отличается от группы сравнения. Так же к 14 сут у животных данной группы отмечается повышение концентрации общих SH-групп по отношению к 7-м сут в той же группе на 30,7%, по отношению к группе сравнения 26,8%.

Опираясь на вышеизложенное можно заключить, что применение полилактоидного микрокамерного раневого покрытия, загруженного перкарбонатом натрия, оказывает действие на ферментативное звено антиоксидантной защиты, снижая активность СОД, но, не влияя на активность каталазы. Так же применение раневого покрытия с перкарбонатом натрия оказывает значимое влияние на тиоловый статус на поздних стадиях репаративного процесса.

### Обсуждение

В ответ на повреждение ткани запускается ряд местных и общих защитно-приспособительных процессов, приводящих к образованию большого количе-

ства свободных радикалов. Свободные радикалы в зоне альтерации образуются на всем протяжении течения раневого проса, в результате случайных утечек электронов, а так же окисления побочных продуктов [13-16]. Повышение концентрации АФК вызывает активацию антиоксидантных систем организма, что проявляется увеличением продукции антиоксидантных ферментов [10-12].

В системе антиоксидантной защиты важную роль занимает фермент супероксиддисмуза (СОД). Роль СОД сводится к инактивации супероксидного анион-радикала. Активность (т. е. скорость дисмутации) супероксиддисмутазы в общем случае зависит от скорости генерации, степени агрегированности, концентрации  $H_2O_2$ , концентрации глутатиона и других донаторов SH-групп, концентрации NO, пероксинитрита,  $O_2^-$ , эйказаноидов, биогенных аминов [17].

Следует отметить, что приведенные примеры факторов влияющих на активность супероксиддисмутазы во многом зависят от ее типа. Экспрессия генов СОД-1 является конститутивной (постоянной) и мало меняется при повышении концентрации активных форм кислорода и других метаболитов, в то же время экспрессия генов СОД-2 является индуцибельной и напрямую зависит от концентрации активных форм кислорода и таких метаболитов как TNF-альфа, IFN-гамма, IL-1, IL-6 [18, 19]. С другой стороны СОД-2 устойчива к повышению концентрации  $H_2O_2$ , тогда как СОД-1 при повышении концентрации перекиси водорода реагирует уменьшением удельной активности фермента за счет повышения количества агрегированных фракций [20].

Приведенные данные литературы объясняют результаты настоящего исследования. Так, к 7 дню эксперимента в крови животных, которым выполнена острая эксцизионная кожная рана (группа сравнения), происходит двукратное увеличение суммарной активности изоформ СОД в сыворотке крови. Альтерация тканей приводит к образованию большого количества активных форм кислорода и к синтезу таких цитокинов как TNF-альфа, IFN-гамма, IL-1, IL-6 [18, 19]. Активные формы кислорода повышают активность СОД-1 за счет ее распада до мономеров, а так же наряду с TNF-альфа, IFN-гамма, IL-1, IL-6 усиливают генерацию СОД-2,3 [18, 19]. К 14-дню исследования активность СОД в сыворотке остается высокой, но имеет тенденцию к снижению, вероятно за счет накопления  $H_2O_2$  и снижения концентрации указанных эйказаноидов.

Важную роль в антиоксидантной системе играет фермент каталаза. Этот фермент в отличие от других ферментов антиоксидантной системы, не требует вос-



становителя для протекания реакции. Активность каталазы зависит от скорости генерации каталазы [21], степени агрегированности каталазы [22].

Опираясь на вышеизложенное, можно предположить следующую цепь событий. Повреждение кожного покрова крысы способствует образованию АФК, в том числе накоплению  $H_2O_2$ . Эти соединения, во-первых усиливают синтез каталазы, во вторых повышают скорость ее тетрамеризации. Повышение активности каталазы в сыворотке крови может быть обусловлено диффузией АФК или самих активированных ферментов в кровотоки. В результате к 7 дню эксперимента наблюдается двукратное повышение активности каталазы у крыс группы сравнения, относительно контроля. Повышенная активность сохраняется вплоть до 14-х сут, что указывает на системный характер реакций антиоксидантной защиты организма в целом.

Немалое значение в системе антиоксидантной защиты занимают тиоловые соединения. К числу тиоловых белков с антиоксидантными свойствами относятся как ферменты (глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, пероксиредоксины, сульфидредоксины, глутаредоксины), так и неферментативные белки (глутатион, тиоредоксины). Все эти соединения объединяет наличие в их структуре функциональных сульфгидрильных (SH)-групп [23]. Наличие сульфгидрильных групп у данных соединений позволяет им подвергаться обратимым окислительно-восстановительным реакциям с радикалами, с образованием тиолсульфидных групп [24]. Тиоловые соединения являются удобным средством оценки функционального состояния антиоксидантной защиты. При большом количестве свободных радикалов снижается концентрация сульфгидрильных (SH)-групп и повышается концентрация тиолсульфидных (-S-S-) групп.

В настоящем исследовании к 7 дню эксперимента в крови животных, которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны (группа сравнения) статистически значимо снижается концентрация (SH)-групп, что указывает на потребление неферментных антиоксидантов и связано с образованием большого количества свободных радикалов при альтерации тканей. К 14-м сут прооксидантная активность падает, что выражается статистически значимым увеличением концентрации (SH)-групп, относительно 7-го дня исследования в той же группе. При этом цифры не достигают значений контрольной группы, что говорит о продолжающемся оксидативном стрессе, хоть и менее выраженном.

Таким образом, эксцизионное повреждение кожи приводит к активации ферментативного и нефермен-

тативного звена антиоксидантной защиты. Активация указанных звеньев может быть связана с образованием в зоне альтерации активных форм кислорода.

Применение полилактоидного микрокамерного раневого покрытия без активных компонентов в опытной группе № 1 не оказывает значимого влияния на соотношение прооксидантных и антиоксидантных сил. Значения активности каталазы и супероксиддисмутазы неотличимы от животных группы сравнения. Лишь к 14-м сут наблюдается повышение концентрации тиоловых (SH)-групп, которые обычно первые реагируют на изменения в системе антиоксидантной защиты. Данная реакция, вероятно, связана с механическими свойствами раневого покрытия. Раневое покрытие механически препятствует смещению поврежденных тканей относительно друг друга в процессе жизнедеятельности крысы, препятствуя вторичной альтерации.

В последние годы значительно возрос интерес к применению антиоксидантов в составе средств для ухода за ранами. Согласно данным литературы, антиоксидантные соединения, полученные из растений, имеют большой потенциал для включения в различные биоматериалы, включая волокна, губки, наночастицы, гидрогели и мембраны. Это обусловлено способностью антиоксидантов предотвращать избыточное накопление АФК в ране, что способствует ускорению репаративных процессов [25]. В ходе биохимических исследований установлено, что покрытия с таниновой кислотой на 7-е и 14-е сут эксперимента повышают тиоловый статус на 19% по сравнению с аналогом без активных компонентов. Повышение тиолового статуса, а следовательно, и сокращение потребления SH групп, под влиянием таниновой кислоты в составе покрытия свидетельствует о выраженном антиоксидантном эффекте, что согласуется с данными литературы [26]. Антиоксидантные эффекты таниновой кислоты реализуются за счет нескольких механизмов, включая прямое поглощение свободных радикалов, что объясняется наличием свободных -ОН групп в бензольном кольце, активацию ферментативных антиоксидантных систем, в том числе хинон-оксиредуктазы, глутатион-трансферазы, уридин-5-дифосфатглюкоранил-трансферазы, ингибирования активности оксидаз, а именно ксантиноксидазы, циклооксигеназы, липооксигеназы, митохондриальной сукциноксидазы и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидоксидазы [27]. Установлено, что на 7-е и 14-е сут эксперимента активность СОД (на 21% и 16% соответственно) и каталазы (на 27% и 24% соответственно) ниже у крыс, которым дефект кожи закрывался покрытием с таниновой кис-

лотой по сравнению с животными, у которых применялся аналог без активных компонентов.

Таким образом, освобожденная из микрокамер таниновая кислота оказывает значительное влияние на течение раневого процесса и в частности на его окислительно-восстановительные процессы. К 14 дню исследования показатели активности каталазы и супероксиддисмутазы стремятся к показателям контрольной группы, а показали тиолового статуса его достигают.

Применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия загруженного перкарбонатом натрия так же оказывает значительное влияние на окислительно-восстановительный гомеостаз в области раневого дефекта, что проявляется снижением активности СОД, восстановлению концентрации тиоловых (SH)-групп в сыворотке крови на поздних этапах репаративного процесса.

Известно, что при контакте с межклеточной средой в процессе биodeградации полилактоида, кристаллический перкарбонат натрия разлагается на перекись водорода и среднюю соль натрия и угольной кислоты. Освободившиеся из покрытия молекулы перекиси водорода могут способствовать агрегации мономеров СОД [19], с образованием димеров, тетрамеров, и больших агрегатов, тем самым снижая ее ферментативную активность, что приводит к выявленному снижению активности фермента у крыс опытной группы № 3 относительно группы сравнения.

Известно, что перекись водорода обладает бактерицидным эффектом, препятствуя инфицированию раны, что в конечном итоге приводит к снижению вторичной альтерации [9]. Снижение вторичной альтерации может объяснять уменьшение количества и стимулирующего влияния DAMP за счет ускорения эпителизации раны [28]. Ранее было показано, что небольшие концентрации  $H_2O_2$  за счет стимуляции ангиогенеза увеличивают скорость заживления раневого дефекта у мышей [28]. Вероятно, что за счет активации репаративных механизмов, и частичного восстановления структуры тканей, происходит снижение выработки эндогенных АФК, что проявляется обнаруженным увеличением концентрации тиоловых групп на 14 сут эксперимента.

Отсутствие снижения активности каталазы на 14-е сут эксперимента у крыс опытной группы № 3 может быть связано с непосредственным стимулирующим действием перекиси водорода на экспрессию каталазы [29].

Таким образом, применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия, загруженного перкарбонатом натрия в области раневого дефекта, спо-

собствует снижению активности СОД, восстановлению концентрации тиоловых (SH)-групп в сыворотке крови на поздних этапах репаративного процесса.

### Заключение

Эксцизионное повреждение кожи приводит к активации ферментативного и неферментативного звена антиоксидантной защиты, что проявляется стойким увеличением активности СОД и каталазы, а также снижением концентрации тиоловых соединений в сыворотке крови.

Применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия, загруженного таниновой кислотой, частично нивелирует сдвиги параметров антиоксидантной защиты, препятствуя снижению концентрации тиоловых групп и повышению активности антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы).

Применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия, загруженного перкарбонатом натрия в области раневого дефекта, снижает активность СОД, частично восстанавливает концентрацию тиоловых (SH)-групп в сыворотке крови на поздних этапах репаративного процесса, но при этом не оказывает влияния на активность каталазы.

### Литература

(п.п. 2–3; 7–15; 17–23; 25; 26; 28; 29 см. References)

1. Бобылев С.Н., Бурлакова Е.А., Ваган И.С., Васильев И.В., Волков И.Н., Гохберг Л.М. и др. *Российский статистический ежегодник*. 2022; 76.
4. Кириязи Т.С., Ермаков А.В., Савкина А.А., Ленгерт Е.В., Степанова Т.В., Лойко Д.Д., Кузнецова Н.А., Иванов А.Н. Влияние микрокамерных раневых покрытий на динамику микроциркуляторных реакций в зоне полнослойного дефекта кожи у белых крыс. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2022; 21(2): 43-50. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2022-21-2-43-50>
5. Иванов А.Н., Ермаков А.В., Ленгерт Е.В., Степанова Т.В., Савкина А.А., Кириязи Т.С. *Раневое микрокамерное покрытие из полилактоида и способ его получения*. Патент №2023117375/04(037127); заявл. 30.06.2023. Решение о выдаче от 12.12.2023.
6. Муромцева Е.В., Сергацкий К.И., Никольский В.И., Шабров А.В., Альджабр М., Захаров А.Д. Лечение ран в зависимости от фазы раневого процесса. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2022; 3(63): 93-109.
16. Харечкина Е.С., Никифорова А.Б. Механизмы генерации активных форм кислорода при пермеабиллизации митохондриальных мембран. *Современные проблемы науки и образования*. 2018; 4. <https://doi.org/10.17513/spno.27719>
24. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатиотрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. *Biochemistry (Moscow)*. 2014; 79(13): 1562-83.

27. Зиятдинова Г.К., Будников Х.К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии: современное состояние и перспективы развития. *Russ chem rev.* 2015; 84(2): 194–224.

### References

- Bobylev S.N., Burlakova E.A., Vagan I.S., Vasiliev I.V., Volkov I.N., Gohberg L.M., et al. M. *Russian Statistical Yearbook. [Rossiyskiy statisticheskiy ezhegodnik]*. 2022; 76. (In Russian)
- Verdolino D.V., Thomason H.A., Fotticchia A., Cartmell S. Wound dressings: curbing inflammation in chronic wound healing. *Emerg Top Life Sci.* 2021; 5(4): 523–37.
- Bi H., Feng T., Li B., Han Y. In vitro and in vivo comparison study of electrospun PLA and PLA/PVA/SA fiber membranes for wound healing. *Polymers (Basel)*. 2020; 12(4): 839.
- Kiriyaizi T.S., Ermakov A.V., Savkina A.A., Lengert E.V., Stepanova T.V., Loiko D.D., et al. The microchamber wound coatings effect on the microcirculatory reactions dynamics in the full-thickness skin defect area in white rats. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya*. 2022; 21(2): 43–50. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2022-21-2-43-50> (In Russian)
- Ivanov A.N., Ermakov A.V., Lengert E.V., Stepanova T.V., Savkina A.A., Kiriyaizi T.S. *Wound microchamber coating made of polylactide and method for its production. [Ranevoe mikrokamernoe pokrytie iz polilaktida i sposob ego polucheniya]*. Patent 2023117375/04(037127), RF; 2023. (In Russian)
- Muromtseva E.V., Sergatskiy K.I., Nikol'skiy V.I., Shabrov A.V., Al'dzhabr M., Zakharov A.D. Treatment of wounds depending on the phase of the wound process. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskiye nauki*. 2022; 3(63): 93–109. (In Russian)
- Deng L., Du C., Song P., Chen T., Rui S., Armstrong D.G., et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 8852759. Published 2021 Feb 4. <https://doi.org/10.1155/2021/8852759>
- Fang K., Gu Q., Zeng M., Huang Z., Qiu H., Miao J., et al. Tannic acid-reinforced zwitterionic hydrogels with multi-functionalities for diabetic wound treatment. *Journal of materials chemistry. B.* 2022; 10(22): 4142–52.
- Zhu G., Wang Q., Lu S., Niu Y. Hydrogen Peroxide: A Potential Wound Therapeutic Target?. *Med Princ Pract.* 2017; 26(4): 301–8. <https://doi.org/10.1159/000475501>
- Lewandowski L., Kepinska M., & Milnerowicz H. The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases. *European journal of clinical investigation.* 2019; 49(1): e13036. <https://doi.org/10.1111/eci.13036>
- Nandi A., Yan L.J., Jana C.K., Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2019; 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Comini M.A. Measurement and meaning of cellular thiol: disulfide redox status. *Free radical research.* 2016; 50(2): 246–71. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1110241>
- Antonucci S., Di Sante M., Tonolo F., Pontarollo L., Scalco V., Alano P., et al. The determining role of mitochondrial reactive oxygen species generation and monoamine oxidase activity in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Antioxid Redox Signal.* 2021; 34(7): 531–50. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7929>
- Filipovic M.R., Koppenol W.H. The Haber-Weiss reaction – The latest revival. *Free Radic Biol Med.* 2019; 145: 221–2. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.017>
- Valgimigli L. Lipid peroxidation and antioxidant protection. *Biomolecules.* 2023; 13(9): 1291. Published 2023 Aug 24. <https://doi.org/10.3390/biom13091291>
- Kharechkina, Ekaterina & Nikiforova, A.B. Mechanisms of reactive oxygen species production upon permeabilization of mitochondrial membranes. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2018; 4. (In Russian). <https://doi.org/10.17513/spno.27719>
- Tokuda E., Marklund S.L., Furukawa Y. Prion-like properties of misfolded Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis: update and perspectives. *Yakugaku Zasshi.* 2019; 139(7): 101519. <https://doi.org/10.1248/yakushi.18-00165-5>
- Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 2002; 33(3): 337–49. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x)
- Zheng M., Liu Y., Zhang G., Yang Z., Xu W., Chen Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants (Basel)*. 2023; 12(9): 1675. Published 2023 Aug 27. <https://doi.org/10.3390/antiox12091675>
- Eleutherio E.C.A., Silva Magalhaes R.S., de Araujo Brasil A., Monteiro Neto J.R., de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 2021; 697: 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
- Hur J., Kang E.S., Hwang J.S., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$ -mediated upregulation of catalase helps to reduce ultraviolet B-induced cellular injury in dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2021; 103(3): 167–75. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2021.08.003>
- Chakravarti R., Gupta K., Majors A., Ruple L., Aronica M., Stuehr D.J. Novel insights in mammalian catalase heme maturation: effect of NO and thioredoxin-1. *Free Radic Biol Med.* 2015; 82: 105–13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.030>
- Oliveira P.V.S., Laurindo F.R.M. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clin Sci (Lond)*. 2018; 132(12): 1257–80. Published 2018 Jun 21. <https://doi.org/10.1042/CS20180157>
- Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. Biochemistry (Moscow). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. 2014; 79(13): 1562–83. (In Russian)
- Fadilah N.I.M., Phang S.J., Kamaruzaman N., Salleh A., Zawani M., Sanyal A., Maarof M., Fauzi M.B. Antioxidant Biomaterials in Cutaneous Wound Healing and Tissue Regeneration: A Critical Review. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Mar 23; 12(4): 787.
- Cheng M., Hu L., Xu G., Pan P., Liu Q., Zhang Z. Tannic acid-based dual-network homogeneous hydrogel with antimicrobial and pro-healing properties for infected wound healing. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2023; 227: 113354.
- Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C. Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development. *Russian Chemical Reviews.* 2015; 84 (2): 194–224. (In Russian)
- Loo A.E., Wong Y.T., Ho R., Wasser M., Du T., Ng W.T., et al. Effects of hydrogen peroxide on wound healing in mice in relation to oxidative damage. *PLoS one.* 2012; 7(11): e49215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049215>
- Heck D.E., Shakarjian M., Kim H.D., Laskin J.D., Vetrano A.M. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1203: 120–5. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x>

**Сведения об авторах:**

**Иванов Алексей Николаевич**, доктор мед. наук, зав. отд-нием лабораторной диагностики НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, зав. ЦНИЛ, зав. каф. нормальной физиологии им. И.А. Чуевского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Сахань Максим Алексеевич**, ассистент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чуевского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Ермаков Алексей Вадимович**, мл. науч. сотр., ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Савкина Ангелина Альбертовна**, мл. науч. сотр., ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Степанова Татьяна Вячеславовна**, мл. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Никитина Виктория Викторовна**, канд. мед. наук, доцент каф. клин. лаб. диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Ленгерт Екатерина Владимировна**, мл. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

**Кириязи Татьяна Святославовна**, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чуевского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

© Саркисян Н.С., Куличенко А.Н., 2024  
УДК 612:115

Саркисян Н.С., Куличенко А.Н.

## Маркеры гемостаза и воспаления при бруцеллёзной инфекции

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора,  
355035, Ставрополь, Россия, ул. Советская, д. 13-15

Актуальность проблемы бруцеллёзной инфекции на современном этапе обуславливает необходимость продолжения векторных исследований по изучению патогенеза болезни в том числе – маркеров воспаления и гемостаза, процессов развития эндотелиальной дисфункции. Объект исследования – больные с диагнозом «острый бруцеллёз», проходившие стационарное лечение в инфекционной больнице. **Цель исследования** – определение уровня маркеров воспаления и гемостаза: факторов свёртывания (XII, X, V, II), эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов (нитритов ( $\text{NO}_2^-$ /нитратов ( $\text{NO}_3^-$ )), фактора Виллебранда, васкулоэндотелиального фактора, в сыворотке/плазме крови больных острым бруцеллёзом и выявление патофизиологической связи с возможным развитием дисфункции эндотелия.

**Методика.** Исследование маркеров эндотелиальной дисфункции - эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов (нитритов и нитратов  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ), фактора Виллебранда, васкулоэндотелиального фактора у 32 человек с лабораторно подтверждённым диагнозом «острый бруцеллёз» проведено методом твердофазного иммуноферментного анализа. Определение концентрации факторов свёртывания крови: XII, X, V, II осуществлено клоттинговым методом на автоматическом анализаторе гемостаза STA Compact.

**Результаты.** Показано повышение синтеза васкулоэндотелиального фактора ( $344,7 \pm 6,8$  МЕ/мл), эндотелина-1 ( $3,89 \pm 0,24$  пг/мл), окиси азота и её метаболитов (нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ) –  $207,4 \pm 11,0$  мкмоль/л); нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ) –  $170,9 \pm 10,2$  мкмоль/л), ( $p \leq 0,001$ ), свидетельствующее об эндотелиальной дисфункции. Отмечено снижение факторов плазменно-коагуляционного звена гемостаза у больных острым бруцеллёзом (концентрация фактора XII составила  $50,6 \pm 14,0\%$ ; фактора X  $50,4 \pm 13,1\%$ ; фактора V  $38,8 \pm 11,0\%$ ; фактора II  $60,9 \pm 14,5\%$  по сравнению с группой контроля ( $p \leq 0,05$ )), что возможно, связано с защитной реакцией, препятствующей тромбообразованию и кровотечению, но ведущей к нарушению поддержания гомеостаза эндотелиальных клеток – «стратегия сдерживания» – защитно-приспособительная реакция, направленная на снижение интенсивности системного воспалительного ответа.

**Ключевые слова:** бруцеллёз; факторы свёртывания крови; дисфункция эндотелия; эндотелин-1; окись азота; фактор Виллебранда; васкулоэндотелиальный фактор.

**Для цитирования:** Саркисян Н.С., Куличенко А.Н. Маркеры гемостаза и воспаления при бруцеллёзной инфекции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(2): 68-75.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.68-75

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, проведение исследований, сбор и описание материала, подготовка иллюстративного материала – Саркисян Н.С.; концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Куличенко А.Н. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Саркисян Нушик Сааковна, e-mail: nyshik25@yandex.ru

**Финансирование.** Работа не имела спонсорской поддержки.

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

Поступила 29.02.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N.

## Markers of hemostasis and inflammation in brucellosis infection

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor,  
13-15 Sovetskaya st., Stavropol, 355035, Russian Federation

Presently, the relevance of brucellosis infection demonstrates the need for continued vector research to study the pathogenesis of the disease, including markers of inflammation and hemostasis, and the processes of endothelial dysfunction development. The study subjects were patients diagnosed with acute brucellosis who were undergoing inpatient treatment in an infectious diseases hospital.

**Aim:** To measure markers of inflammation and hemostasis, including coagulation factors (XII, X, V, II), endothelin-1, nitric oxide and its metabolites (nitrite (NO<sub>2</sub>-/nitrate (NO<sub>3</sub>-)), von Willebrand factor, and vascular endothelial growth factor (VEGF), in the blood serum/plasma of patients with acute brucellosis and to identify any pathophysiological connection with possible development of endothelial dysfunction.

**Methods.** A study of markers of endothelial dysfunction - endothelin-1, nitric oxide and its metabolites (nitrite (NO<sub>2</sub>-/nitrate (NO<sub>3</sub>-)), von Willebrand factor, vascular endothelial growth factor (VEGF) in 32 people with a laboratory confirmed diagnosis of «acute brucellosis» was carried out using enzyme-linked immunosorbent assay. Determination of the concentration of blood coagulation factors: XII, X, V II was carried out using the clotting method on an automatic hemostasis analyzer STA Compact.

**Results.** In patients with acute brucellosis, increases in the synthesis of VEGF (344.7±6.8 IU/ml), endothelin-1 (3.89±0.24 pg/ml), and nitric oxide and its metabolites (nitrite (NO<sub>2</sub>) – 207.4±11.0 μmol/l; nitrate (NO<sub>3</sub>) – 170.9±10.2 μmol/l), (*p*≤0.001), indicated endothelial dysfunction. Plasma coagulation factors decreased (factor XII concentration was 50.6±14.0%; factor X 50.4±13.1%; factor V 38.8±11.0%; and factor II 60.9±14.5% of control group values, (*p*≤0.05)). This was possibly due to a protective reaction that prevents thrombus formation and bleeding but leading to disruption of the endothelial cell homeostasis, i.e. – a «containment strategy,» a protective and adaptive response aimed at reducing the intensity of the systemic inflammatory response.

**Keywords:** brucellosis; blood clotting factors; endothelial dysfunction; endothelin-1; nitric oxide; von Willebrand factor; vascular endothelial growth factor

**For citation:** Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N. Markers of hemostasis and inflammation in brucellosis infection. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2) 68-75. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.68-75

**Authors' contribution:** concept and design of the study, conducting research, collecting and describing material, preparing illustrative material – Sarkisyan N.S.; concept and design of the study, editing the article – Kulichenko A.N. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** *Sarkisyan Nushik Saakovna*, head of the department of consulting and preventive work, clinical laboratory diagnostics doctor, candidate of medical sciences, e-mail: nyshik25@yandex.ru

### Information about the authors:

Sarkisyan N.S., <https://orcid.org/0000-0003-3512-5738>  
Kulichenko A.N., <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

**Financing.** The work had no sponsorship.

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

Received 29.02.2024

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

## Введение

В настоящее время активно изучается роль маркеров воспаления и гемостатических факторов в патогенезе инфекционных заболеваний.

Длительно протекающая инфекция способствует нарушению гемостаза, гемодинамики, развитию альтернативного и продуктивного воспаления, что приводит к полиорганным поражениям [1]. В научной литературе у больных бруцеллёзом описаны клинические

случаи эндотелиального артериита, флебита, тромбоцитопенической пурпуры, экзематозной сыпи, узловой эритемы, тромбоцитарной микроангиопатии, кожного, гранулематозного и лейкоцитокластического васкулита [1-5]. В исследовании М.С. Ferrero и соавт. [6] показано, что *Brucella abortus* и *Brucella suis* могут реплицироваться в первичных эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) и в линии эн-

дотелиальных клеток микрососудов НМЕС-1, приводя к развитию провоспалительного иммунного ответа, что клинически проявляется васкулитом, инфекционным эндокардитом.

Полиморфизм клинической картины бруцеллёза связан с патогенетическими особенностями незавершённого фагоцитоза и длительной персистенцией возбудителя в тканях мононуклеарной фагоцитарной системы, включая костный мозг, лимфатические узлы, печень и селезёнку, что обуславливает высокий риск перехода в хроническое течение заболевания [5]. Неспецифичность клинической картины острого бруцеллёза является следствием развития бактериемии [7]. Все эти аспекты послужили основой для изучения маркеров гемостаза и воспаления при бруцеллёзной инфекции.

Учитывая сродство бруцелл к ретикулоэндотелиальной системе при бруцеллёзе часто встречается диффузное поражение печени, которое обычно носит доброкачественный характер и проявляется гепатоспленомегалией, цитолитическим синдромом. Патоморфологическое поражение печени при бруцеллёзной инфекции носит характер хронического гранулематозного гепатита. Описаны случаи абсцессов печени и селезёнки [8, 9].

Печень играет ключевую роль в первичном и вторичном гемостазе, и является местом синтеза всех факторов свёртывания и их ингибиторов за исключением фактора Виллебранда, который синтезируется эндотелием (тельца Вейбеля-Паладе), и содержится в тромбocyтах ( $\alpha$ -гранулы). Заболевание печени приводят к нарушениям в системе гемостаза, но при этом сохраняется баланс между свёртывающей и противосвёртывающей системами со сниженным резервом, и этот баланс легко нарушается в ту либо в другую сторону [10].

Комплексное изучение основных факторов свёртывания, участвующих во внутреннем, внешнем и общем путях свёртывания позволит оценить патофизиологические механизмы гемокоагуляции и воспаления при бруцеллёзной инфекции.

Механизм развития нарушений системы гемостаза у больных бруцеллёзом до конца не изучен, значение факторов воспаления и гемокоагуляции остаётся невыясненными. Нарушения в системе гемостаза при бруцеллёзе развивается вследствие эндотоксикоза, гиперцитокинемии, системного характера инфекции и [11] приводят к эндотелиальной дисфункции.

Анализ научной литературы, позволяет рассматривать данные показатели (факторы свёртывания (XII, X, V, II), эндотелин-1, окись азота и её метаболиты (нитриты (NO<sub>2</sub>-)/нитраты (NO<sub>3</sub>-)), фактор Виллебранда,

васкулоэндотелиальный фактор) одновременно как маркеры гемостаза и воспаления, роль которых в патогенезе бруцеллёзной инфекции нуждается в изучении.

**Цель исследования** – определение уровня маркеров воспаления и гемостаза: факторы свёртывания (XII, X, V, II), эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов (нитритов (NO<sub>2</sub>-)/нитратов (NO<sub>3</sub>-)), фактора Виллебранда, васкулоэндотелиального фактора в сыворотке/плазме крови больных острым бруцеллёзом и выявление патофизиологической связи с возможным развитием дисфункции эндотелия.

### Методика

Для решения поставленных в работе задач в течение 2021-2022 гг. был исследован клинический материал (плазма/сыворотка крови) от 32 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом «острый бруцеллёз», поступивших в инфекционное отделение, специализированное по диагностике, лечению и профпатологии бруцеллёза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя и ГБУ Республики Дагестан «Республиканский центр инфекционных болезней, профилактики и борьбы со СПИДом им. С.М. Магомедова». Образцы крови были получены при поступлении больного в стационар. Срок заболевания больных бруцеллёзной инфекцией составил от 2 до 6 недель. В контрольную группу были включены 34 человека, не переболевших бруцеллёзом и не вакцинированных против этой инфекции.

Критерии исключения из исследования: острые инфекционные заболевания (кроме бруцеллёза), обострение тяжелых соматических заболеваний, опухоли любой локализации, диффузные заболевания соединительной ткани.

Отбор и рандомизацию больных бруцеллёзом производили в соответствии с индивидуальными регистрационными картами больных (истории болезни) с учётом классификации клинических форм бруцеллёза по Г.П. Рудневу (1955). Все больные острым бруцеллёзом имели среднюю степень тяжести течения болезни, в фазе компенсации. По характеру очаговых поражений преобладала комбинированная форма (локомоторная и висцеральная) бруцеллёза. При госпитализации были выявлены следующие клинические синдромы: астенический, артритический, вегетативный, лимфопролиферативный, а также гепатомегалия, спленомегалия. При анализе историй болезни у 41,1% больных бруцеллёзом отмечалась гепатоспленомегалия; у 7,35% клинически отмечались гемостазиологические изменения капиллярного типа (образование петехий, экхимозов на кожных покровах); в частности,

при анализе историй болезни у больных бруцеллёзом выявлялся инфекционно-токсический васкулит/капилляротоксикоз.

Среди обследованных преобладали мужчины (70 %), при этом различие показателей в зависимости от пола в обследуемых группах не имело статистической значимости, в связи, с чем мы сочли возможным объединить их в группу без учета половой принадлежности. Возраст обследованных – от 18 до 69 лет.

Все обследуемые дали информированное добровольное согласие на участие в настоящих исследованиях (согласно Федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» от 21.11.2011 № 323-ФЗ, ред. от 30.12.2021). Клинические исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (заключение локального этического комитета № 109 от 19 мая 2022).

Преаналитический этап лабораторных исследований проводили в соответствии с существующими приказами и рекомендациями Министерства здравоохранения РФ по контролю качества лабораторных исследований. Образцы венозной крови забирали утром натощак в пробирку с 3,8% (0,129 М) раствором цитрата натрия в соотношении 1:9 с забираемой кровью и доставляли в лабораторию. Обеззараживание исследуемого материала (крови) осуществляли в соответствии с СанПиНом 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Материалом для исследования служила плазма/сыворотка крови. Определение маркеров эндотелиальной дисфункции – концентрации эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов (нитритов и нитратов  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ), фактора Виллебранда, васкулоэндотелиального фактора выполняли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов Endothelin 1 - ELISA (R&D systems, США), Total NO Nitrate/Nitrite (R&D systems, США), Technozym vWF:Ag ELISA (Австрия), VEGF-БЕСТ», (Вектор-Бест, Россия). Оптическую плотность реакционной смеси регистрировали с применением фотометра для микропланшет ELx808 производства BioTek Instruments (США).

Определение факторов свёртывания крови проводили на автоматическом анализаторе гемостаза STA Compact (Roche diagnostics, Франция), с применением следующих наборов реагентов: STA®-ImmunoDef XII; STA®-Deficient X; STA®-Deficient V, STA®-Deficient II (Франция, Ирландия). Для проведения контроля качества клоттинговых исследований факторов свёртыва-

ния применяли системную универсальную контрольную плазму STA®-System Control N+P (STAGO, Франция, Ирландия). В качестве калибровочной плазмы применили калибратор STA®-Unicalibrator (STAGO, Франция).

Для статистического анализа использовали t-критерий Стьюдента, уровень достоверности принимали равным при  $p \leq 0,05$ . Для доказательства нормальности распределения данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова.

### Результаты и обсуждение

В ходе проведённого исследования установлено, что у больных бруцеллёзом концентрация фактора XII составила  $50,6 \pm 14,0$  %, что ниже в сравнении со значением в контрольной группе  $95,3 \pm 17,4$  % ( $p \leq 0,05$ ). Отмечено снижение фактора X –  $50,4 \pm 13,1$  %, по отношению к группе контроля  $89,9 \pm 14,5$  %. Уровень фактора V в плазме больных острым бруцеллёзом по сравнению с данными контроля –  $93,6 \pm 12,4$  % составил  $38,8 \pm 11,0$  %. Анализ данных показал количественное снижение фактора II  $60,9 \pm 14,5$  % относительно группы сравнения  $98,7 \pm 11,52$  % ( $p \leq 0,05$ ).

Снижение уровня фактора свёртывания XII возможно защищает организм от тромбоза. Известно, что при массивном накоплении возбудителя в условиях формирования индуцированного бруцеллами незавершённого фагоцитоза лимфоузлы становятся резервуарами бактерий, откуда патоген может поступать в кровь и распространяться по всему организму, инициируя формирование второй фазы гематогенного заноса [8]. Во вторую фазу развивается бактериемия и эндотоксинемия. Мы предполагаем, что в острую фазу при эндогенной интоксикации ЛПС бруцелл связываясь с фактором Хагемана оказывает так называемый «эффект сдерживания» – защитно-приспособительная реакция, направленная на снижение интенсивности системного воспалительного ответа, не приводящая к тромбообразованию.

Полученные данные подтверждают исследование R.K. Mailer [12], в котором отмечено, что дефицит фактора XII защищает организм от тромбоза, и не связан с кровотечением.

Кроме того, показано, что липополисахариды активируют фактор XII [13, 14]. В эксперименте [13] было продемонстрировано, что фактор Хагемана связывается с растворимым бактериальным липополисахаридом (эндотоксин), выделенным из *Escherichia coli* 0111:B4, и этот комплекс обладает способностью превращать прекалликреин в его активную форму (продукты распада XII фактора). Эксперимент пока-



зал, что активация фактора Хагемана связана с липидом А молекулы ЛПС. Отрицательно заряженные фосфатные группы этой части или ковалентно связанные жирные кислоты могут связывать фактор Хагемана, вызывая конформационное изменение, приводящее к активации свертывания крови и прекалликреина, что подтверждает концепцию о том, что бактериальные эндотоксины способны инициировать активность внутренней системы свертывания крови. Высокие концентрации ЛПС подавляют фактор Хагемана, вероятно, за счет прямого взаимодействия ЛПС с фактором Хагемана.

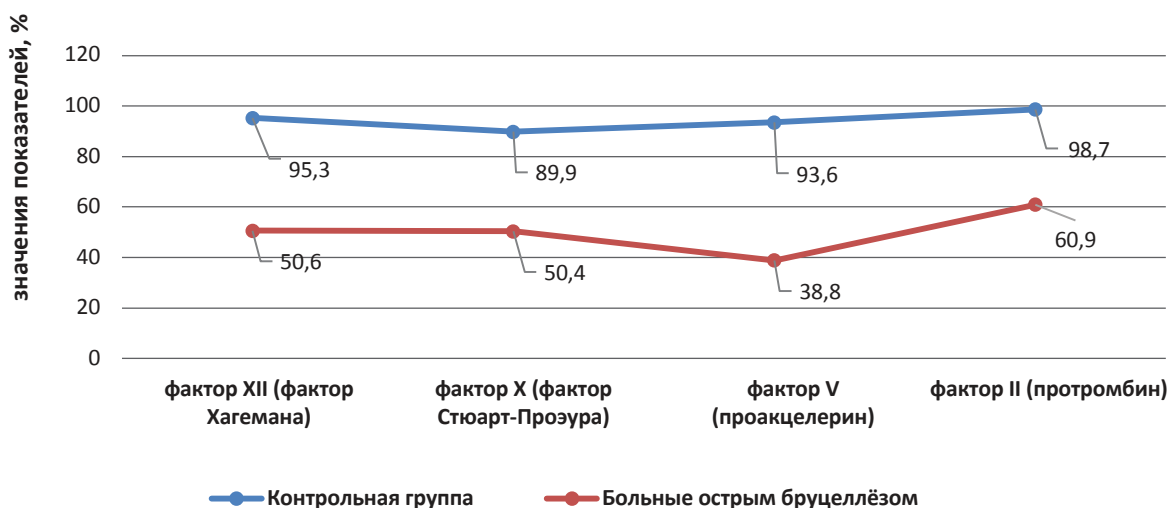
ЛПС *Brucella* имеет «неканоническую» структуру липида А, антигенная активность данного ЛПС количественно и качественно отличается от «классического» ЛПС энтеробактерий. В липиде А бруцелл степень гетерогенности может зависеть главным образом от различных замен жирных кислот; липид А содержит большой остаток жирных кислот по сравнению с ЛПС энтеробактерий. Точную роль фактора XII в защите макроорганизма еще предстоит установить, и она может зависеть также и от факторов патогенности возбудителя бруцелллёза.

В настоящем исследовании отмечено снижение плазменных факторов гемостаза, и мы предполагаем,

что возможный дефицит витамин-К-зависимых факторов свертывания (X, II), вырабатываемых печенью обусловлен гематогенной диссеминацией бруцелл, приводящей к диффузному поражению печени, проявляющийся гепатоспленомегалией и цитолитическим синдромом, и как следствие ведущей к нарушению функций гепатоцитов (из лимфатических узлов возбудитель бруцелллёза периодически проникает в кровь и распространяется по всему организму, избирательно поражая ткани ретикулоэндотелиальной системы – печень, селезенку). Дисбаланс факторов свертывания приводит к нарушениям в системе гомеостаза и гемостаза, но при бруцеллезной инфекции сохраняется баланс между свертывающей и противосвертывающей системами. Анализ историй болезни больных бруцеллезом показал, что у 41,1% клинически отмечается гепатоспленомегалия потенциально приводящая к снижению уровня факторов свертывания (X, V, II). Данные представлены на рисунке.

Результаты проведенных исследований указывают на тенденцию к снижению показателей плазменно-коагуляционного звена гемостаза при бруцеллезной инфекции, что клинически обычно не проявляется кровотечением (тромбообразованием).

### Факторы свёртывания



Значения показателей плазменных факторов свертывания крови в группах сравнения.  $p \leq 0,05$  достигнутый уровень значимости критерия различий по сравнению с контрольной группой.

Values of plasma coagulation factors in comparison groups.  $p \leq 0,05$  achieved level of significance for the criterion of differences compared to the control group.

По данным научной литературы изменения в показателях свёртывающей системы крови при других инфекциях, вызванных грамм-отрицательными бактериями, определяются прежде всего структурой ЛПС, в частности компонентом липида А, приводящим к различиям в передаче сигналов Toll-подобными рецепторами (TLR), синтезом провоспалительных цитокинов. Бактериальный эндотоксин (ЛПС) запускает внутренний путь гемостаза за счёт связывания фактора свертывания крови XII с липидом А молекулы ЛПС. Гетерогенность структуры ЛПС зависит прежде всего от различных замен жирных кислот, и определяет различие его биологической активности, что возможно может послужит основой при изучении маркеров гемостаза в патогенезе других инфекций [15, 16]. Ключевой патофизиологической особенностью структуры ЛПС возбудителя бруцеллёза является липид А, который содержит большой остаток жирных кислот по сравнению с ЛПС энтеробактерий [16], механизм активации внутренней системы свёртывания крови при бруцеллёзной инфекции возможно обусловлен данным специфическим аспектом.

Безусловно, необходимо дальнейшее комплексное изучение уровня плазменных факторов свёртывания крови для более глубокого понимания «эффекта сдерживания» этих маркеров в патогенезе бруцеллёза, что, возможно, позволит определить их значимость в качестве критериев степени тяжести заболевания и прогноза его течения.

В ходе проведенного исследования показано повышение синтеза васкулоэндотелиального фактора ( $344,7 \pm 6,8$  МЕ/мл), эндотелина-1 ( $3,89 \pm 0,24$  пг/мл), окиси азота и её метаболитов (нитритов ( $\text{NO}_2$ -  $207,4 \pm 11,0$  мкмоль/л; нитратов ( $\text{NO}_3$ -  $170,9 \pm 10,2$  мкмоль/л) относительно группы сравнения ( $p < 0,001$ ). Отмечалось статистически незначимое различие фактора Виллебранда у больных бруцеллёзом  $1,43 \pm 0,72$  МЕ/мл в сравнении с группой контроля  $1,05 \pm 0,66$  МЕ/мл.

Необходимо отметить, что независимо от того, что во всей выборке больных бруцеллёзом отмечалось повышение маркеров эндотелиальной дисфункции, у основной части больных бруцеллёзной инфекцией патогенетически запускалась защитная реакция, направленная на снижение интенсивности бактериемии за счет активации моноцитарно-макрофагальной системы, неспецифичность клинической картины острого бруцеллёза является следствием развития бактериемии, и лишь у 7,35% больных бруцеллёзом клинически отмечались гемостазиологические изменения капиллярного типа (т.е. истощение компенса-

торных механизмов, приводящих к дисфункции эндотелия), что патофизиологически зависит от количества ЛПС вовлеченного во вторую патогенетическую фазу бруцеллёзной инфекции (бактериемия/эндотоксинемия).

Таким образом, при системном воспалении, формирующемся при бруцеллёзе на фоне снижения плазменных факторов гемостаза уровень эндотелиальных маркеров воспаления повышается, наблюдается выраженный дисбаланс в системе гемостаза, и при длительном воздействии эндотоксина компенсаторные механизмы истощаются, эндотелиоциты перестают адекватно функционировать, в них происходят необратимые структурные и биохимические изменения, развивается дисфункция эндотелия.

Повышение концентрации изученных показателей коррелирует с развитием дисфункции эндотелия, что вероятно, может быть ранним маркером поражения эндотелия сосудов микроциркуляторного русла у больных бруцеллёзом, приводящим к развитию полиорганной недостаточности.

### Заключение

В ходе проведенного исследования у больных острой формой бруцеллёза отмечено статистически значимое снижение показателей плазменно-коагуляционного звена системы гемостаза (факторы: XII, X, V, II), что позволяет предположить, что выявленное снижение уровня плазменных факторов свёртывания при бруцеллёзной инфекции приводит к компенсаторным сдвигам регуляции системы гемостаза, и нарушению поддержания гомеостаза эндотелиальных клеток – «стратегия сдерживания». Маркеры, отражающие степень повреждения эндотелия, коррелируют с клиническими проявлениями у больных бруцеллёзом, так у 7,35% отмечался инфекционно-токсический васкулит/капилляротоксикоз, проявляющийся в виде гемостазиологических изменений капиллярного типа (образование петехий, экхимозов на кожных покровах), что указывает на ослабление барьерных свойств эндотелия, и сопряжено с системной воспалительной реакцией, приводящей к микросудистым осложнениям. Воспаление капилляров при бруцеллёзной инфекции, вызванное повреждающим действием иммунных комплексов, клинически проявляется геморрагиями (расстройством циркуляции крови в мелких кровеносных сосудах).

Взаимодействие факторов свёртывания с эндотелиальными клетками является ключевым патогенетическим аспектом системного воспалительного ответа. Результаты проведённых исследований ука-

зывают на повышение синтеза эндотелиального оксида азота, уровня эндотелина-1, васкулоэндотелиального фактора, выявленные изменения сопряжены с системной воспалительной реакцией, возможно приводящей к микрососудистым осложнениям при бруцеллезной инфекции. Воспалительные реакции при бруцеллезе слабоманифестны, имеют преимущественно пролиферативный характер и тесно ассоциированы с реакциями иммунитета [17]. Вместе с тем воспаление достаточно продолжительное, что обусловлено длительной персистенцией бруцелл в инфицированных тканях, и это в конечном итоге приводит к воспалительной альтерации [17]. Патологические и компенсаторно-приспособительные реакции в ответ на повреждающий фактор (эндотоксин) приводят к повреждению эндотелия, и впоследствии к дисфункции [18].

Развитие воспалительной реакции на начальных стадиях бруцеллезной инфекции связано с супрессией системы врожденного иммунитета макроорганизма и представляет особый интерес с точки зрения взаимосвязи между коагуляцией и воспалением. Очевидно, что эндогенная интоксикация, бактериемия, внутриклеточное паразитирование, персистенция, незавершенный фагоцитоз, формирование сенсбилизации при бруцеллезной инфекции приводят к развитию эндотелиальной дисфункции, ведущей к нарушению микроциркуляции, способствуя формированию полиорганных поражений [16, 17].

Дальнейшее углубленное изучение маркеров гемостаза и воспаления, позволит оценить их патофизиологическую роль в патогенезе бруцеллеза с целью оценки прогноза и тяжести течения инфекции.

### Литература

(п.п. 2-4; 6; 7; 9; 11-15 см. References)

1. Малеев В.В. Система гомеостаза и состояние эндотелия при инфекционной патологии. *Инфекционные болезни*. 2009; 7: 1-15.
  5. Малов В.А. Терапевтические маски бруцеллеза. *Фарматека*. 2011; 4: 22-8.
  8. *Клинические рекомендации «Бруцеллез у детей и взрослых»*. СПб.: МОО «АВИСПО»; 2020.
  10. Решетняк В.И., Маев И.В., Решетняк Т.М., Журавель С.В., Писарев В.М. Заболевания печени и гемостаз (обзор). Часть I. Нехолестатические заболевания печени и гемостаз. *Общая реаниматология*. 2019; 15(5): 74-87. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-5-74-87>
  16. Онищенко Г.Г. *Бруцеллез. Современное состояние проблемы (издание второе, дополненное)*. Нижний Новгород: Союзполиграф Кириллица; 2021.
  17. Пономаренко Д.Г., Саркисян Н.С., Куличенко А.Н. Патогенез бруцеллеза. Анализ иммунопатологической концепции. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020; 9(3): 96-105. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3-96-105>
  18. Саркисян Н.С., Куличенко А.Н. Значение дисфункции эндотелия в патогенезе бруцеллеза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2023; 12(1): 105-9. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-1-105-109>
- ### References
1. Maleev V.V. The homeostasis system and the state of the endothelium in infectious pathology. *Infektsionnye bolezni*. 2009; 7: 1-15. (in Russian)
  2. Herrick J.A., Lederman R.J., Sullivan B., Powers J.H., Palmore T.N. Brucella arteritis: clinical manifestations, treatment, and prognosis. *Lancet Infect. Dis*. 2014; 14(6): 520-6. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70270-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70270-6)
  3. Karaali Z., Baysal B., Poturoglu S., Kendir M. Cutaneous manifestations in brucellosis. *Indian J. Dermatol*. 2011; 56(3): 339-40. <https://doi.org/10.1155/2016/5740589>
  4. Korkmaz P., Kadir M., Namdar N.D., Özmen A., Uyar C., Değir A.N. A case of brucellosis with recurrent attacks of vasculitis. *Case Rep. Infect. Dis*. 2016; 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5740589>
  5. Malov V.A. Therapeutic masks for brucellosis. *Farmateka*. 2011; 4: 22-8. (in Russian)
  6. Ferrero M.C., Bregante J., Delpino M.V., Barrionuevo P., Fossati C.A., Giambartolomei G.H., et al. Proinflammatory response of human endothelial cells to Brucella infection. *Microbes Infect*. 2011; 13(10): 852-61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.04.010>
  7. Memish Z., Mah M.W., Al Mahmoud S., Al Shaalan M., Khan M.Y. Brucella bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients. *J. Infect*. 2000; 40(1): 59-63.
  8. *Clinical recommendations «Brucellosis in children and adults»*. [Klinicheskie rekomendatsii «Brutsellyoz u detey i vzroslykh»]. St. Petersburg: MOO «АВИСПО»; 2020. (in Russian)
  9. Chourmouzi D., Boulogianni G., Kalomenopoulou M., Kanellos I., Drevelas A. Brucella liver abscess; imaging approach, differential diagnosis, and therapeutic management: a case report. *Cases Journal*. 2009; 2: 7143.
  10. Reshetnyak V.I., Mayev I.V., Reshetnyak T.M., Zhuravel' S.V., Pisarev V.M. Liver diseases and hemostasis (review). Part I. Non-cholestatic liver diseases and hemostasis. *Obshchaya reanimatologiya*. 2019; 15(5): 74-87. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-5-74-87> (in Russian)
  11. Akbayram S., Dogan M., Akgun C., Peker E., Parlak M., Oner A.F. Disseminated intravascular coagulation in a case of brucellosis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2011; 17(6): 567-E230.
  12. Mailer R.K., Rangaswamy C., Konrat S., Emsley J., Renné T. An update on factor XII-driven vascular inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. Review*. 2022; 1869(1): 119166. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119166>
  13. Morrison D.C., Cochrane C.G. Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). *J. Exp. Med*. 1974; 140: 797-811.
  14. Kenne E., Nickel K.F., Long A.T., Fuchs T.A., Stavrou E.X., Stahl F.R., et al. Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *J. Intern. Med*. 2015; 278: 571-85.

15. Schletter J., Heine H., Ulmer A.J., Rietschel E.T. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol.* 1995; 164: 383-9. <https://doi.org/10.1007/s002030050279>
16. Onishchenko G.G. *Brucellosis. Current state of the problem (second edition, updated). [Sovremennoe sostoyanie problem].* Nizhniy Novgorod: Soyuzpoligraf Kirillika; 2021. (in Russian)
17. Ponomarenko D.G., Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N. Pathogenesis of brucellosis. Analysis of the immunopathological concept. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie. (Infectious diseases: news, opinions, training).* 2020; 9(3): 96-105. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3-96-105> (in Russian)
18. Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N. The significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of brucellosis. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2023; 12(1): 105-9. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-1-105-109> (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Саркисян Нушик Сааковна**, канд. мед. наук, зав. отделом консультационно-профилактической работы, врач клинической лабораторной диагностики, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора;  
**Куличенко Александр Николаевич**, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор института, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора.

## Обзоры

© Евдокимова Н.В., Черненко Т.В., 2024  
УДК 616-093/-098

**Евдокимова Н.В., Черненко Т.В.**

### Микробиом кишечника человека: научная парадигма и клиническая практика

ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы,  
129090, Москва, Россия, Большая Сухаревская пл., д. 3, корп. 1

Исследования микробиома человека, начатые 15 лет назад и активно продолжающиеся в настоящее время, позволили во многом пересмотреть наши взгляды о глубинных механизмах взаимодействия организма человека и населяющих его микроорганизмов. Представшая картина оказалась много сложнее, чем ожидалось, особенно это относится к микробиому кишечника. В настоящее время научные концепции того, что из себя представляет микробиом кишечника, продолжают активно разрабатываться. В основе их лежит, конечно, редукционный подход. Так, предлагается теория «корового микробиома» и сопряженная с ней концепция «здорового микробиома». Еще более упрощенно подходит к решению проблемы многообразия и вариабельности кишечных микробиомов теория «энтеротипов». Она допускает существование предпочтительных (устойчивых) вариантов микробиомов, структурно организованных вокруг определенных групп микроорганизмов. Если структурообразующими являются анаэробные грамотрицательные палочки, то такие микробиомы отличаются низким видовым разнообразием, доминированием небольшой группы микроорганизмов и низкой стрессоустойчивостью. Именно такие типы микробиомов обнаруживают у пациентов с различными патологиями, в том числе, внекишечной локализации. Поэтому предполагается, что выделение энтеротипов имеет практический смысл. В настоящее время научная концепция микробиомов имеет мало выходов в медицинскую практику. Но уже имеющийся практический опыт применения про- и синбиотиков, препаратов бактериофагов и фекальной трансплантации свидетельствует о реальной возможности изменения микробиомов для профилактики и лечения различных заболеваний человека.

**Ключевые слова:** кишечный микробиом; коровый микробиом; энтеротипы микробиомов; направленное моделирование микробиомов; фекальная трансплантация

**Для цитирования:** Евдокимова Н.В., Черненко Т.В. Микробиом кишечника человека: научная парадигма и клиническая практика. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(2): 76-86.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.76-86

**Участие авторов:** концепция, подготовка рукописи к печати – Евдокимова Н.В.; редактирование – Черненко Т.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Евдокимова Наталья Витальевна, e-mail: env1111@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело финансовой поддержки.

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

Поступила 18.09.2023

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024

**Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V.**

### The human gut microbiome: scientific paradigm shifts and clinical practice today and tomorrow

N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine,  
3 Bolshaya Sukharevskaya Ploshchad, Moscow, 129090, Russian Federation

The study of the human microbiome, which began 15 years ago and is actively ongoing at the present time, has largely resulted in reconsideration of our views on the underlying mechanisms of interaction between the human body and the microorganisms inhabiting it. The picture that emerged has turned out to be much more complex than expected, especially for the gut microbiome. At present, the scientific concepts of what constitutes the gut microbiome are actively developing. They are based, of course, on a reductionist approach. Thus, the theory of «a core microbiome» and the associated concept of «a healthy microbiome» have been proposed. An even more simplified approach to solving the problem of diversity and variability of intestinal microbiomes is the theory of «enterotypes.» It presupposes the existence of preferred (stable) variants of microbiomes structurally organized around certain groups of microorganisms. If anaerobic gram-negative rods are structure-forming, then such microbiomes are

characterized by low species diversity, dominance of a small group of microorganisms, and low stress resistance. These types of microbiomes are found in patients with various pathologies, including extraintestinally localized. Therefore, it is assumed that stratification of microbiomes based on enterotypes is convenient from the practical point of view. At present, the scientific concept of microbiomes has little input into medical practice. However, the already existing experience of using pre- and symbiotics, bacteriophages and fecal transplantation indicates the real possibility of changing microbiomes for the prevention and treatment of various human diseases.

**Keywords:** gut microbiome; core microbiome; microbiome enterotypes; directed microbiome modeling; fecal transplantation

**For citation:** Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V. The human gut microbiome: scientific paradigm shifts and clinical practice today and tomorrow. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 76-86. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.76-86

**Author's contribution:** conceived the article and drafted the manuscript – Evdokimova N.V.; editing the text – Chernenkaya T.V. The final version approval, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** **Natalya V. Evdokimova**, PhD, Senior researcher at the laboratory of Clinical microbiology, 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 18.09.2023

Accepted 25.04.2024

Published 14.06.2024

## Введение

Концепция «микробиома человека» сформировалась в последние 10–15 лет в результате обобщения результатов мегагрантных международных проектов («The Human Microbiome Project (НМР, iНМР)» США, 2007–2016). В настоящее время продолжается активное изучение микробиома человека на всех континентах. Уже полученные данные позволили воссоздать картину микровселенной с невероятным богатством микробного мира и сложными связями с организмом человека. Новые открытия, как это часто бывает, породили новые вопросы, ответы на которые в дальнейшем должны решить насущные проблемы реальной практики. В настоящем обзоре мы попытались представить современные представления о микробиоме человека, рассмотрев структуру и функциональные особенности кишечного микробиома, который нередко называют еще одним органом человека. Кроме того, мы постарались найти точки соприкосновения между научными концепциями и нуждами практической медицины, которые в будущем должны перерасти в разработку эффективных систем профилактики и лечения многих заболеваний человека. Наше изложение будет в определенной степени тезисным, поскольку имеющийся материал очень обширный, иногда противоречивый и не всегда поддается строгой систематизации.

## Что такое микробиом

Термин «микробиом» был введен экологами в официальный научный обиход в 80-ые годы 20 века для описания функциональных особенностей отдельных экологических ниш, в которых обитают определенные группы организмов. Если посмотреть шире и обратиться к трудам основоположников природной микробной экологии (Виноградский С.Н., Бейеринк М.В.), то становится очевидным, что сам принцип изучения микроорганизмов в неразрывной связи с их средой обитания, был ясно сформулирован уже в конце 19 – начале 20 века.

Существуют две трактовки понятия «микробиом» – широкая и несколько суженная. С одной стороны, термин «микробиом» используют как синоним «микробиоты», и под ним подразумевают совокупность всех микроорганизмов, населяющих организм человека, включая бактерии, археи, грибы, а также вирусы. С другой стороны, в рамках подходов геномики, которые, собственно, и легли в основу современной концепции «микробиома», под «микробиомом» подразумевают некий коллективный геном резидентных (постоянно обитающих) микроорганизмов, или, говоря другими словами, «метагеном». В основе такой двойности, в большей степени, лежит не инерционность научного мышления, а реальные трудности в опреде-

лении видовой структуры кишечных микробиомов на основе данных метагеномных исследований. Определение числа видов, реально обитающих в кишечнике человека, до сих пор представляет собой непростую задачу. Сначала пришли к заключению, что микробиом кишечника человека содержит не менее 1000 видов микроорганизмов [1]. В дальнейшем оценки становились более сдержанными, и в настоящее время предполагается, что число видов не превышает 100, а отношение числа клеток человека к числу клеток микроорганизмов снизилось на два порядка – с 1:100 до 1:1 [2]. Поэтому исследователи сообществ микроорганизмов, населяющих природные местообитания и организм человека, под «микробиомом» подразумевают «микробиоту», генетическую информацию о которой мы пока еще не до конца расшифровали. Исследователям регуляции физиологической активности микроорганизмов-симбионтов человека в норме и при патологии более близок метагеномный подход (микробиота – суть коллективный геном). Страдает ли от такой несогласованности возможность практического применения результатов изучения микробиома на современном этапе? Сказать трудно, поскольку эта неоднозначность связана с реальной ограниченностью наших знаний. Но, несомненно, этот факт следует иметь в виду, погружаясь в море обширной научной литературы, посвященной изучению микроорганизмов, населяющих организм человека – его пищеварительный тракт, кожу, носоглотку, влагалище и т.д.

В данном обзоре мы будем использовать интегральный подход, вынужденно сохраняя эту двойственность, стараясь оперировать термином «микробиом» в первом (более понятном для микробиологов смысле), при этом не забывая, что многие положения и выводы делаются, главным образом, на основе метагеномного подхода. Кроме того, нам кажется, что, говоря о микробиоме, стоит не забывать о микробных метаболитах, а также иметь в виду определенную микросреду обитания, которая формируется как реакция организма человека на метаболическую «деятельность» микробиоты. Сразу оговоримся, что взаимодействие с иммунной системой, важность которого для поддержания гомеостаза в системе «человек-микробиом» ни у кого не вызывает сомнения, мы оставили за рамками нашего обзора, ввиду непомерной обширности материала. Этот аспект наших представлений о микробиоме требует отдельного рассмотрения.

*Словарь основных понятий.* Термины, используемые при изучении микробиомов, часто употребляют без четкого обозначения понятийных границ, предполагая, что это общеизвестно (в узком кругу специа-

листов). Поэтому поясним значение основных терминов, беря за основу краткость, четкость и удобство использования [3]:

- микробиота – сообщество микроорганизмов, обитающих в данном биоматериале;
- метагеном – совокупный набор генов всех микроорганизмов, выделенный из данного образца;
- метатранскриптом – полный профиль матричной РНК в пробе;
- метапротеом – полный белковый профиль пробы;
- метаболом – все органические соединения, синтезируемые микроорганизмами, включая малые молекулы, в пробе;
- «омиксные» технологии – от общего английского окончания для всех четырех технологий: метагеномика («metagenomics»), метатранскриптомика («metatranscriptomics»), метапротеомика («metaproteomics»), метаболомика («metabolomics»).

Особо стоит сказать о культуromике («culturomics») [4]. Она скромно пристроилась недалеко от «омиксных» технологий, представляя собой сплав сразу нескольких подходов – классического микробиологического (посев и выделение чистой культуры) с последующей идентификацией всех выросших клеточных «клонов» (колоний). Для видовой идентификации используется весь арсенал современных методов – от масс-спектрометрии (MALDI-TOF) до молекулярно-биологических методов. В культуromике, как и в методах классической микробиологии, уязвимым местом остается подбор сред и условий для культивирования микроорганизмов, особенно анаэробных, доминирующих среди симбионтов человека.

### Микробиом кишечника

Несомненно, в иерархии микробиомов кишечный представляет собой «верховный орган», как в численном, так и в функциональном отношении. Именно кишечная микрофлора осуществляет поддержание гомеостаза в системе «человек-микробиота», подавляя рост патогенной микрофлоры, регулируя процессы пищеварения и получения энергии, а также синтез многих жизненно важных метаболитов (витаминов, нейромедиаторов, жирных кислот, гормоноподобных соединений, ферментов, расщепляющих ксенобиотики и т.д.), подавляя или активируя разные звенья иммунной системы. Кроме того, показана особо важная роль микробиоты в развитии воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, онкологических забо-

леваний печени и поджелудочной железы, метаболического синдрома, аутоиммунных и неврологических заболеваний [3, 5].

Уже первые результаты, полученные на весьма ограниченной в численном отношении группе здоровых добровольцев, показали не только невероятное разнообразие видов микроорганизмов у каждого конкретного индивидуума ( $\alpha$ -разнообразие) и сложную индивидуальную динамику, но и еще больший разброс между отдельными участниками групп ( $\beta$ -разнообразие). Довольно быстро стало понятно, что подходы классической экологии, да и микробной экологии, базирующиеся на них, слабо применимы к такой сложной системе [6, 7]. Большие надежды возлагались на молекулярно-биологические методы, арсенал которых весьма обширен и продолжает постоянно пополняться. Появляются новые методы анализа нуклеотидных последовательностей в рамках как таргетного (поиск конкретных генов), так и полного секвенирования. Кроме того, происходит совершенствование методов математической обработки полученных данных (новые биоинформационные технологии). Еще в 70-ые годы 20 века, то есть задолго до начала работы проектов HMP и iHMP, для изучения строения длинных молекул ДНК был разработан так называемый метод «обрыва цепи» по Сэнгеру (англ. «whole-genome «shotgun» metagenomic sequencing, WGS»). Он основан на модифицированной форме полимеразной цепной реакции, и состоит в секвенировании фрагментов длинных молекул ДНК с последующим сшиванием полученных последовательностей с помощью специальных математических программ. В свободном доступе в настоящее время имеется обширный банк генов GenBank [8]. Процесс обратного реконструирования (вычленение или воссоздание структуры длинных компонентов из массива коротких последовательностей) – наиболее ответственный этап метагеномных исследований, проводимых с помощью WGS. Для анализа полученных данных необходима база данных, содержащая информацию о референсных генах, представляющих собой «отпечатки» референсных штаммов. Эта база на сегодняшний день еще не создана. Поэтому получается своеобразный порочный круг, когда новые обширные данные требуют систематизации и структурирования, а для этого они уже должны быть встроены в систему (их нужно знать «в лицо»). Получено огромное количество метагеномов, но их расшифровка значительно отстает. Для преодоления этих трудностей при метагеномных исследованиях нередко оперируют условным понятием «метагеномные виды» («metagenomic species, MGS») [6], или ведется поиск маркерных генов, кото-

рые в достаточной мере характеризуют виды микроорганизмов («metagenomic operational taxonomic units, mOTUs») [9]. Попытки решения возникающих трудностей путем совершенствования биоинформационных программных алгоритмов пока не привели к ожидаемым результатам: новые алгоритмы не позволяют адекватно описывать структуру микробных сообществ человека [10]. В частности, камнем преткновения была и остается невозможность учета варибельности референсных генов (эта проблема существует при использовании всех таргетных генов, даже генов рибосомальной *16 S pPHK*).

### «Здоровый» микробиом кишечника

Несмотря на наличие объективных трудностей, наши знания о микробиомах постепенно расширяются. Так, уже первые результаты изучения микробиомов здоровых добровольцев показали преобладание представителей двух фил, включающих в себя строгих анаэробов – *Bacteroidetes* (грамотрицательные палочки) and *Firmicutes* (грамположительные бактерии, среди которых всем известны бифидобактерии и лактобактерии, но много и некультивируемых форм) [11–13]. Напомним, что филы представляют собой типы (по старой номенклатуре) или группы классов, то есть являются крупными таксономическими единицами. Другие группы микроорганизмов составляют не более 5% от общего видового разнообразия. К более редким представителям кишечной микрофлоры относят бактерии следующих групп: *Proteobacteria* (известные представители – сем. *Enterobacteriaceae*), *Verrucomicrobia* (грамотрицательные палочки, большинство видов некультивируемые, некоторые способны окислять метан), *Actinobacteria* (актиномицеты, близкие к ним полиморфные или образующие мицелий грамположительные палочки), *Fusobacteria* (грамотрицательные полиморфные палочки, строгие анаэробы). При стрессовых ситуациях, на фоне развития некоторых патологий именно эта малочисленная группа начинает вытеснять «бактероиды» и «фирмикуты», видовое разнообразие которых резко снижается [13]. Однако представители основного блока не исчезают даже при хронических воспалительных заболеваниях кишечника, но выделяются в значительно обедненном составе (видовом и массовом) [13].

Однако следует сказать, что консенсус по вопросу о том, какой микробиом следует считать «здоровым», до сих пор не достигнут [14]. Практическая необходимость в прояснении этого вопроса стимулирует продолжение работ по поиску так называемого «корового» микробиома, состоящего из постоянно обнаружи-



ваемых видов микроорганизмов [15]. Для преодоления трудностей, связанных с невероятным видовым разнообразием и динамичностью видовой структуры микробиомов, предлагается опираться не на видовой состав микробиомов, а на их функциональные (метаболические) особенности. Разрабатываются концепции существования функциональных групп микроорганизмов, действующих согласованно в рамках определенных экологических ниш, которые не только реализуют конкретные метаболические функции, но и поддерживают свою структурную организацию, формируя своеобразную сеть [16]. Правомерность такого подхода получила ряд подтверждений при оценке результатов применения фекальной микробной трансплантации (ФМТ). ФМТ вполне успешно используют для лечения хронических воспалительных заболеваний кишечника, в первую очередь, вызванных токсигенными штаммами *Clostridium difficile* (недавно переименован в *Clostridioides difficile*) [12]. Сопоставление метагеномов доноров и реципиентов показало, что микробные популяции по-разному приживаются в кишечнике реципиентов. Успех в колонизации кишечника реципиентов донорскими видами микроорганизмов находился в прямой зависимости от частоты встречаемости данных видов в микробиомах здоровых доноров (данные взяты из международных баз данных, число образцов в которых на момент проведения исследований приблизилось к 2000) [16]. Иными словами, виды, часто обнаруживаемые в образцах доноров и здоровых добровольцев, успешно приживались в кишечнике реципиентов. «Хорошие» колонизаторы – 20 популяций, из которых 15 относились к *Firmicutes*, 4 – к *Bacteroidetes* и 1 популяция – к группе *Actinobacteria*. Примечательно, что неудачливые «переселенцы» принадлежали к *Firmicutes*. При этом вырисовывалась интересная картина. При переносе микробных популяций донора происходил отбор видов, обладающих большей метаболической независимостью, которая проявлялась в способности синтезировать все «критические» метаболиты или факторы роста, включая незаменимые аминокислоты, витамины группы В, нуклеотиды и другие кофакторы. Эти виды бактерий в лабораторных условиях растут на простых небогатых средах. Иными словами, после проведения ФМТ происходило выпадение метаболически малоактивных видов (не способных синтезировать ростовые факторы), которые широко представлены в микробиоме здоровых доноров. Интересно, что победители и аутсайдеры ФМТ могли относиться к представителям одного и того же семейства, рода и даже вида [12]. Таким образом, концепция «корового» микробиома получила допол-

нительные доказательства правомерности своего существования, но не на видовом, а на функциональном уровне. Однако видовое разнообразие, которое наблюдалось в микробиомах здоровых доноров, не сохранялось в микробиомах реципиентов. Поскольку исследование ограничивалось периодом чуть больше года, вопрос о том, насколько стабилен и стрессоустойчив сконструированный микробиом реципиента, остается открытым. Следует отметить еще одну интересную деталь. Приживаемость донорских микробных популяций зависела от способа доставки материала в организм реципиента, причем неожиданно оральный прием таблетированных форм показал лучшие результаты, по сравнению с ФМТ с помощью колоноскопии. Эти результаты определенным образом согласуются с исследованиями, показавшими взаимосвязь между «коровыми» микробиомами ротоглотки и кишечника [3, 11]. Авторы исследования даже предполагали в дальнейшем разработать критерии диагностики состояния кишечных микробиомов на основании изменений в микробиоме ротоглотки.

Исходя из вышесказанного, можно с достаточной степенью уверенности утверждать, что концепцию дисбиоза, которая давно внедрена и принята медицинским сообществом, следует рассматривать не столько с точки зрения структурных, сколько с точки зрения функциональных нарушений.

#### **Функциональная структура здорового микробиома**

В результате исследований кишечных микробиомов, проведенных объединенным исследовательским европейским проектом *MetaHIT* (15 стран, 8 институтов), был составлен каталог генов, которые кодируют около 20 000 различных метаболических путей [3, 17]. Следует отметить, что большая часть исследованной когорты здоровых добровольцев представлена городскими жителями. Данных о микробиомах сельского (не городского) населения чрезвычайно мало [15, 17]. В экономически развитых странах, возможно, различия между городским и сельским населением постепенно нивелируются в результате всеобщей необратимой урбанизации, однако в экономически бедных странах эти различия, по-видимому, сохраняются.

Изучение метаболомов кишечника показало функциональную избыточность – дублирование процессов метаболизма ростовых субстратов, синтеза или трансформации жизненно важных микробных метаболитов, которые могут осуществляться как грамположительной, так и грамотрицательной анаэробной микрофлорой кишечника. Эта избыточность базиру-

ется, в том числе, на сетевой структурной организации микробиомов.

Основная функция кишечной микробиоты – участие в переваривании пищи, преимущественно в ферментации трудноперевариваемых растительных волокон, которые организм человека не в состоянии усваивать без помощи микроорганизмов. В результате ферментации растительных волокон образуются короткоцепочечные жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират), газы и другие метаболиты [18]. Бутират является главным источником энергии для колоноцитов, участвует в поддержании энергетического и окислительного гомеостаза клеток кишечника, в частности, индуцирует апоптоз опухолевых клеток [18]. Пропионат, попадая в печень человека, участвует в глюконеогенезе и других важных метаболических процессах. Ацетат принимает участие в липидном обмене, в регуляции синтеза холестерина и является одним из основных энергетических субстратов для кишечной микрофлоры. Кроме того, мы уже упоминали такие важные и полезные для организма человека функции микробиоты кишечника, как синтез витаминов, аминокислот, ферментов, участвующих в трансформации желчных кислот и ксенобиотиков [3, 5].

На основе созданного банка генов была разработана концепция «минимального кишечного генома», который бы обеспечивал выживание кишечной микрофлоры и «минимального кишечного метагенома», который являлся бы базисом для активного функционирования и поддержания гомеостаза всего кишечного микробиома. Насколько такой подход окажется плодотворным, покажет время. Пока имеющиеся пробелы в знаниях о регулировании микробных метаболических путей пытаются восполнить с помощью объединения возможностей всех «омиксных» технологий, привлекая, в том числе, и культурумику [19], а также используя математическое моделирование работы микробных метаболических сетей [20].

#### **Энтеротипы микробиомов и их прогностическая ценность**

Переход на более детальный (видовой или популяционный) уровень исследований структурной и функциональной организации микробиомов кишечника неизменно наталкивается на трудности не только научно-концептуального характера. Речь идет, прежде всего, об отсутствии унифицированных методических подходов на этапах сбора материала, его хранения, выделения ДНК [3]. До сих пор не стихает спор о том, насколько выделяемая просветная микрофлора дистальных отделов кишечника соответствует микрофлоре

мукозного слоя, которая, собственно, и осуществляет взаимодействие с организмом человека. Даже не вступая в область тонкостей геносистематики или филогении, выбора референсных генов и т.д., очевидно, что это приводит к сомнениям относительно возможности сопоставить данные, полученные разными лабораториями. И если эти «шероховатости» в определенной степени были допустимы на первоначальных этапах поисковых исследований, в настоящее время становится очевидно, что ими пренебрегать нельзя.

Данные, полученные в ходе проведения больших международных проектов, в том числе *iHMP*, *Meta-HIT*, показали, что вариабельность в видовом составе микробиома конкретного индивидуума хотя и высокая (« $\alpha$  – разнообразие»), но она намного меньше, чем различия между разными индивидуумами примерно одной возрастной группы, обитающих в одной географической области (« $\beta$  – разнообразие») [15, 17]. Исследования проводились с учетом широкого круга организмов, включая новые виды бактерий, а также археи, вирусы и простейшие. Было показано, что даже сильные изменения структуры микробиома в ответ на кратковременные стрессовые воздействия через непродолжительный промежуток времени нивелировались, и система возвращалась к своему равновесному состоянию (речь идет именно о когорте здоровых людей). Ряд исследователей, однако, настаивает на существовании структурной бимодальности (полярности) у определенных групп микроорганизмов, например, у бактерий рода *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.* и у некоторых некультивируемых групп бактерий из порядка *Clostridiales*). Она проявляется в существовании двух устойчивых состояний микробной системы, при которых эти виды либо полноценно представлены в микробиоме или они отсутствуют, при этом сохраняются все признаки устойчивой экологической системы (высокое видовое разнообразие, выравненность или отсутствие доминирования небольшого числа видов и т.д.) [21].

Была разработана теория существования определенных энтеротипов микробиомов, которая явилась попыткой создания системы, удобной в качестве исследовательского инструмента [21]. Теория энтеротипов разрабатывалась исключительно на основе банка данных, полученных в европейских странах, США и Канаде. Возникшая более 12 лет назад [22], эта теория с самого начала была очень неоднозначно воспринята всем исследовательским сообществом. Ввиду чрезвычайной сложности структуры микробиомов (динамичности состава и высокой его вариабельности) очевидные возражения возникали сразу. Так по-

сле рождения происходит заселение организма ребенка новыми видами микроорганизмов, и этот процесс протекает интенсивно в ранние периоды жизни. В зрелом возрасте система стабилизируется, а ближе к старости видовая сукцессия вновь ускоряется [20]. Любые стрессовые ситуации, например, смена географической локации, изменение образа жизни (диеты, физические нагрузки), и, наконец, заболевания, приводят к сдвигам в структуре микробиома.

Однако теория энтеротипов продолжает находить своих сторонников и приносить научные результаты. Энтеротипы были выделены, исходя из предположения о том, что существует группа микроорганизмов, которая является как бы структурообразующим элементом, драйвером этого сообщества (раньше чаще использовался термин «индикаторные» организмы). Можно отметить попытки выделения типов микробиомов и для других местообитаний (зев, влагалище). Математический анализ, в том числе, кластерный, показал, что удобнее стратифицировать бактерии на родовом, а не видовом уровне. При этом первоначально предполагалось, что возраст, пол, местоположение, культурный бэкграунд человека и другие факторы рассматриваться не будут, и только в дальнейшем эти факторы стали объектам исследования.

Усилия по примирению или согласованию всех имеющихся противоречий в итоге дали определенные результаты. Были привлечены данные не только европейских и американских консорциумов (*HMP*, *MetaHIT*), но и китайские базы данных (*Chinese type II*) [21]. На основе кластерного анализа, суть которого состоит в структурной оптимизации, позволяющей выделить определенные кластеры (группы), члены которых ближе друг к другу по заданным параметрам, чем к членам другого кластера, были выделены значимо различающиеся группы микробиомов. Такой подход срабатывает не всегда, а только в случае, если система реально обладает определенной структурностью. В результате подтвердилась, обнаруженная уже в первых работах [22], возможность стратификации микробиомов на основе определенных структурообразующих групп микроорганизмов (на уровне родов). Такая степень детализации оказалась удобной на этом этапе исследований. Кластерный подход предполагает «огрубление» или редукцию данных (отбрасываются очень редко встречающиеся виды), однако в качестве инструментария для дальнейших исследований он весьма неплох и имеет под собой научную базу. Данные кластерного анализа сопоставили с результатами оценки биоразнообразия методами классической экологии (расчет коэффициентов разнообразия), и были под-

тверждены различия в частоте встречаемости тех или иных групп микробиомов, сгруппированных по кластерному принципу. Были выделены следующие энтеротипы и соответствующие группы драйверных микроорганизмов: энтеротип 1, формирующийся вокруг бактерий рода *Bacteroides spp.*; энтеротип 2 – *Prevotella spp.*, энтеротип 3 – роды из фила *Firmicutes*, в том числе *Ruminococcus spp.* Третий энтеротип – самый многокомпонентный, и его не раз предлагали разделить на несколько подтипов, но так к консенсусу и не пришли. Кроме того, в нем представлено немалое число родов, которые не удалось культивировать. Однако следует заметить, что анализ именно на родовом уровне детализации сразу приводит к глубинному противоречию, поскольку представители одного рода могут содержать виды и штаммы разной степени метаболической активности и патогенности.

Очевидно, что идеальные или «чистые» энтеротипы в реальности не существуют (энтеротип – это исследовательская модель). В реальности мы имеем дело с градиентами и некими частотными максимумами. Максимумов может быть сколько угодно, в зависимости от степени детализации. Еще одно замечание. Структурообразующие виды не обязательно представлены «обильно», но они встроены в микробную сеть в виде обязательного структурного компонента (вспомним упомянутую ранее бимодальность бактерий рода *Bacteroides spp.* и *Prevotella spp.*). Наличие одной драйверной группы родов всегда отрицательно коррелирует с присутствием других. Работы с модельными животными показали наличие и у них определенных энтеротипов [21]. Можно предположить, что энтеротипы соответствуют неким равновесным состояниям системы, которые формируются в ходе симбиоза микроорганизмов и человека, при этом микроорганизмы постоянно оптимизируют свое пребывание в условиях жестких ограничений со стороны макроорганизма.

Данные по изучению физиологических особенностей драйверных видов позволяют сделать ряд предположений. Так бактерии рода *Prevotella spp.* отличаются высокой гидролитической активностью в отношении растительных волокон, в то время как *Bacteroides spp.* обладают большим липолитическим и протеолитическим потенциалом. Представители *Firmicutes* отличаются широким спектром гидролитической активности и медленным метаболизмом. Эти же функциональные особенности, основанные на способности расщеплять те или иные субстраты, обнаруживают у соответствующих энтеротипов [23]. Так микробиомы, близкие к энтеротипу 1, формируются у людей, в рационе которых преобладают животные белки и насыщенные жиры,

а близкие к энтеротипу 2 – у людей, предпочитающих богатые растительной клетчаткой продукты. Люди, обладающие микробиомом, близким к энтеротипу 3, потребляют разнообразные продукты, нередко склонны к избыточному потреблению сахаров и олигосахаридов, характеризуются медленным метаболизмом углеводов и очень экономным расходом энергетических ресурсов. Таким образом, каждый энтеротип имеет свой метаболический профиль. Подтверждением тому служат результаты изучения генов, кодирующих микробные метаболические пути [21].

Экологические характеристики микробиомов разных энтеротипов активно изучаются. Исследования показывают, что наибольшим видовым разнообразием отличаются микробиомы 3 типа, а наименьшим – первого [24]. Однако насколько это видовое богатство является достаточным признаком устойчивого здорового микробиома остается вопросом. Проблема устойчивости микробиомов требует длительных динамических наблюдений, и очевидно, что таких наблюдений пока недостаточно, чтобы сделать окончательные выводы. Имеющиеся данные позволяют полагать, что в естественном здоровом состоянии устойчивость индивидуальных микробиомов высока, и даже смена диеты и местообитания приводит лишь к временным изменениям. Единственным исключением является антибиотикотерапия, которая разрушает исходную структуру кишечного микробиома безвозвратно [24]. Также показано, что, по меньшей мере, у 16% респондентов из европейских баз данных, обнаружена смена энтеротипов без выявления четких причин [21]. По все видимости, устойчивость микробиомов определяется не столько видовым разнообразием, сколько функциональной стабильностью или сбалансированностью работы всей сложной метаболической сети [15]. Так микробиомы 3 типа труднее вывести из равновесного состояния, но и возвращаются в исходное состояние они гораздо дольше. Это связано с преобладанием медленно растущих видов с «небыстрым» метаболизмом [21]. Энтеротипы 1 и 2 характеризуются меньшим видовым разнообразием, активной реакцией на стресс и более быстрым возвращением в исходное состояние при условии, что барьер стрессоустойчивости не был преодолен. По-видимому, «высота» барьера стрессоустойчивости самая большая у микробиомов энтеротипа 3, а у 1 и 2 – ниже. Именно с энтеротипами 1 и 2 связаны состояния, которые характеризуют как дисбиоз. По некоторым оценкам, примерно половину видов микроорганизмов микробиомов (не по биомассе, а по числу видов!) составляют «универсальные» виды, легко метаболизирующие широ-

кий круг субстратов [21, 25]. Они играют роль своеобразного «якоря», способного гасить небольшие возмущения в системе.

Хотя пока еще невозможно предсказать ход событий, но знание того, как конкретные возмущения в системе ведут к изменению видового состава (смена энтеротипа?), могут позволить в будущем корректировать лечение и давать рекомендации в отношении питания. Модуляция микробиома кишечника особенно актуальна для патологических состояний, когда задача состоит в том, чтобы вернуть микробиом к здоровому состоянию, или к тому состоянию, которое предшествовало заболеванию.

### Несколько слов

#### о генетической предрасположенности

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что генетическая преопределенность тех или иных особенностей микробиома важна, но не стоит ее переоценивать [3]. Более важную роль играет длительное воздействие таких факторов, как диета, образ жизни (включая физическую нагрузку, социокультурные особенности). Кроме того, пол, возрастные изменения, болезни, смена географической локации – эти факторы безусловно значимы и во многом определяют динамику изменений микробиома. Маленький пример. При попадании в условия длительной холодной нагрузки в микробиоме происходит накопление представителей *Firmicutes* и уменьшение содержания *Akkermansia muciniphila*, что связано с энергосберегающими способностями первых и энергозатратностью вторых [26].

#### Микробиом кишечника при различных патологиях

Так что же нам может дать знание о состоянии микробиома кишечника? Во-первых, состав и метаболическую активность микробиома можно рассматривать как дополнительный диагностический признак при оценке тяжести заболевания. Кроме того, при умелом использовании, характеристика микробиома может служить индикатором стадий заболевания (прогрессирует оно или нет) и прогноза течения. Еще один важный практический аспект состоит в том, что фармакокинетика и фармакодинамика ряда препаратов зависит от способности микробиома трансформировать эти препараты [21, 27], и эту особенность надо учитывать при разработке лечебных схем.

Анализ имеющихся данных позволяет соотнести наличие того или иного энтеротипа кишечного микробиома с разными патологическими состояниями [21]. Например, у людей с энтеротипом 1 достовер-

но чаще констатируют заболевания печени (неалкогольный стеатоз и гепатоцеллюлярную карциному), а также целиакию и хронические воспалительные заболевания кишечника [21]. У пациентов с раком поджелудочной железы в микробиомах ротовой полости, кишечника и самой поджелудочной железы преобладали бактерии *Prevotella spp.* [28]. И хотя сами авторы термин энтеротип не употребляли, но анализ данных показывает, что структурообразующим видом являлись именно превотеллы, а, следовательно, микробиоценозы можно отнести к типу 2. Доминирование *Prevotella spp.* отмечали при длительной антибиотикотерапии в ходе лечения осложнений, возникших при лечении артритов, диабетической стопы [3, 21]. У людей, обладающих энтеротипом 3 достоверно чаще развивались атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания и метаболический синдром [21, 27].

Изучение изменений структурной организации микробиомов кишечника при болезни Крона и язвенном колите (а это основные воспалительные заболевания кишечника) на фоне явного дефицита *Firmicutes* и повышенного содержания *Bacteroidetes* происходило резкое увеличение частоты выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*) [29]. Для оценки наблюдаемых изменений можно опереться на теорию «корового» микробиома (или общеэкологические принципы) и соотнести ее с теорией энтеротипов: из первой вытекает, что выход на авансцену минорных представителей микробиоты является свидетельством серьезных экологических нарушений, согласно второй — преобладание энтеротипов 1 и 2. Для этих энтеротипов характерно доминирование грамотрицательной анаэробной микрофлоры (напомним, что *Bacteroides spp.* и *Prevotella spp.* относятся к филу *Bacteroidetes*), которая отличается низкой устойчивостью к стрессовым ситуациям, и развитие воспалительных заболеваний кишечника следует ожидать с высокой степенью вероятности. Только принадлежность к энтеротипу 3, когда преобладают грамположительные анаэробные бактерии, относящиеся к типу *Firmicutes*, является хорошим прогностическим признаком, свидетельствующим о стабильности системы и малой вероятности негативного воздействия со стороны кишечной микрофлоры. Отсюда следует, что и возникновение воспалительных осложнений в ходе лечения любой, в том числе и внекишечной патологии, маловероятно.

Особой ремарки заслуживает неправомерность использования в качестве критерия серьезных нару-

шений в структуре микробиома так называемого отношения *Bacteroidetes/Firmicutes* (числа видов одного и другого фила) [30]. Этот показатель уже на коммерческой основе используют диетологи, рекомендуя «научно обоснованные» схемы коррекции веса и для лечения метаболического синдрома. Однако методическая несогласованность, о которой мы говорили ранее, наличие множества противоречивых данных, неполный анамнез — все это не позволяет до конца верифицировать и сопоставлять полученные результаты.

### Заключение

Нельзя отрицать, что вслед за изучением генома человека исследование микробиома стало знаковым явлением науки в начале 21 века. Вложенные огромные материальные и интеллектуальные ресурсы, несомненно, дали свои результаты. Невероятное количество уже накопленных данных о сложном, в структурном и функциональном отношении, строении микробиома требуют разработки не только новых методических подходов, но и поиска новых научных концепций, которые позволили бы изучить и понять механизмы, лежащие в основе взаимодействия организма человека и населяющих его микроорганизмов. Однако следует отметить, что слабым местом остается отсутствие унификации методик сбора, консервации, выделения ДНК и принципов применения того или иного метода секвенирования. Проблемы филогении и геноситематики тоже не решены до конца.

Имея дело со столь сложной системой как микробиомы, использование редукционного подхода (введение понятия энтеротипов), как нам кажется, просто необходимо, особенно это актуально для клинической практики. Многие исследования структурных изменений микробиомов при той или иной патологии исходят из концепции «корового» микробиома, но она более громоздкая и апеллирует к множеству видов, а эта детализация пока мало проясняет картину. В ситуации, когда ненадежно работают оба подхода (у детей и людей преклонного возраста) возможным решением может являться их объединение или корректировка одного с помощью другого. Еще большие надежды возлагаются на потенциал метатранскриптомики, метабономики и метапротеомики, которые пока недостаточно нашли свое применение.

На сегодняшний день научное сообщество только приближается к пониманию того, каким образом можно изменять состояние кишечного микробиома для профилактики и лечения различных патологий, в том числе, внекишечной локализации. Результаты

применения фекальной трансплантации дают много полезной информации для разработки новых тактических подходов по «конструированию» кишечных микробиомов с заданной структурой и свойствами. В будущем предполагается использовать не биологический материал, а пробиотики или синбиотики, включающие сложные микробные сообщества и комплементарные им пребиотики. По-видимому, для этих целей следует использовать штаммы, обладающие более высокой метаболической активностью (или универсальностью), способные конкурировать с «нежелательными» видами кишечной микрофлоры пациентов в пространстве множества экологических ниш кишечника.

Мы еще только в начале пути к практическому применению наших знаний о микробиомах человека, в том числе кишечного, но даже имеющийся практический опыт применения про- и пребиотиков, препаратов бактериофагов и ФМТ свидетельствует о реальности решения такой задачи.

#### Литература/References

- Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., et al. Meta-HIT Consortium. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(8): 834-41. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>
- Sender R., Fuchs S., Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell.* 2016; 164(3): 337-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Kedia S., Ahuja V. Human gut microbiome: A primer for the clinician. *JGH Open.* 2023; 7(5): 337-50. <https://doi.org/10.1002/jgh3.12902> eCollection 2023 May.
- Chang Y., Hou F., Pan Z., Huang Z., Han N., Bin L., et al. Optimization of culturomics strategy in human fecal samples. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2891. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02891> eCollection 2019.
- Marchesi J.R., Adams D.H., Fava F., Hermes G.D., Hirschfield G.M., Hold G., et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016; 65(2): 330-9. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Nielsen H.B., Almeida M., Juncker A.S., Rasmussen S., Li J., Sunagawa S., et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(8): 822-8. <https://doi.org/10.1038/nbt.2939>
- He Y., Wu W., Zheng H.M., Li P., McDonald D., Sheng H.F., et al. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models. *Nat. Med.* 2018; 24(10): 1532-5. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0164-x>
- Li W., O'Neill K.R., Haft D.H., DiCuccio M., Chetvernin V., Badretdin A., et al. RefSeq: expanding the prokaryotic genome annotation pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(D1):D1020-D1028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1105>
- Milanese A., Mende D.R., Paoli L., Salazar G., Ruscheweyh H.J., Cuenca M., et al. Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 1014. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08844-4>
- Meziti A., Rodriguez-R L.M., Hatt J.K., Peña-Gonzalez A., Levy K., Konstantinidis K.T. The reliability of metagenome-assembled genomes (MAGs) in representing natural populations: insights from comparing MAGs against isolate genomes derived from the same fecal sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021; 87(6): e02593-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02593-20>
- Allaband C., McDonald D., Vázquez-Baeza Y., Minich J.J., Tripathi A., Brenner D.A., et al. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 17(2): 218-30. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.017>
- Watson A.R., Füssel J., Veseli I., DeLongchamp J.Z., Silva M., Trigodet F., et al. Metabolic independence drives gut microbial colonization and resilience in health and disease. *Genome Biol.* 2023; 24(1): 78. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02924-x>
- Wexler A.G., Goodman A.L. An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nat. Microbiol.* 2017; 2: 17026. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>
- Eisenstein M. The hunt for a healthy microbiome. *Nature.* 2020; 577(7792): S6-S8. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00193-3>
- Lloyd-Price J., Mahurkar A., Rahnava 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>
- Wu G., Zhao N., Zhang C., Lam Y.Y., Zhao L. Guild-based analysis for understanding gut microbiome in human health and diseases. *Genome Med.* 2021; 13(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00840-y>
- McKeown N.M., Fahey G.C. Jr, Slavin J., van der Kamp J.W. Fibre intake for optimal health: how can healthcare professionals support people to reach dietary recommendations? *BMJ.* 2022; 378: e054370. <https://doi.org/10.1136/bmj-2020-054370>
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486(7402): 207-14. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Whon T.W., Shin N.R., Kim J.Y., Roh S.W. Omics in gut microbiome analysis. *J. Microbiol.* 2021; 59(3): 292-7. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1004-0>
- Tian L., Wang X.W., Wu A.K., Fan Y., Friedman J., Dahlin A., et al. Deciphering functional redundancy in the human microbiome. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 6217. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19940-1>
- Costea P.I., Hildebrand F., Arumugam M., Bäckhed F., Blaser M.J., Bushman F.D., et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* 2018; 3(1): 8-16. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011; 473(7346): 174-80. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Vieira-Silva S., Falony G., Darzi Y., Lima-Mendez G., Garcia Yunta R., Okuda S., et al. Species-function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nat. Microbiol.* 2016; 1(8): 16088. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.88>

24. Pereira F.C., Berry D. Microbial nutrient niches in the gut. *Environ Microbiol.* 2017; 19(4): 1366–78. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13659>
25. Couch C.E., Stagaman K., Spaan R.S., Combrink H.J., Sharp-ton T.J., Beechler B.R., et al. Diet and gut microbiome enterotype are associated at the population level in African buffalo. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 2267. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22510-8>
26. Chevalier C., Stojanović O., Colin D.J., Suarez-Zamorano N., Tarallo V., Veyrat-Durebex C., et al. Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold. *Cell.* 2015; 163(6): 1360–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.004>
27. de la Cuesta-Zuluaga J., Mueller N.T., Corrales-Agudelo V., Velásquez-Mejía E.P., Carmona J.A., Abad J.M., et al. Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading *Akkermansia muciniphila* and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the Gut. *Diabetes Care.* 2017; 40(1): 54–62. <https://doi.org/10.2337/dc16-1324>
28. Chung M., Zhao N., Meier R., Koestler D. C., Wu G., de Castillo E. et al. Comparisons of oral, intestinal, and pancreatic bacterial microbiomes in patients with pancreatic cancer and other gastrointestinal diseases. *J. Oral Microbiol.* 2021; 13(1): 1887680. <https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1887680>
29. Khorsand B., Asadzadeh Aghdai H., Nazemalhosseini-Mojarad E., Nadalian B., Nadalian B., Hourri H. Overrepresentation of enterobacteriaceae and *Escherichia coli* is the major gut microbiome signature in Crohn's disease and ulcerative colitis; a comprehensive metagenomic analysis of IBDMDB datasets. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 12: 1015890. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1015890> eCollection 2022
30. Magne F., Gotteland M., Gauthier L., Zazueta A., Pessoa S., Navarrete P., et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients.* 2020; 12(5): 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>

**Сведения об авторах:**

**Евдокимова Наталья Витальевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы;

**Черенькая Татьяна Витальевна**, канд. мед. наук, зав. лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы.

© Васендин Д.В., 2024

УДК 615.357:577.175.32

**Васендин Д.В.****Ядерные рецепторы к мелатонину**

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет геосистем и технологий» Министерства науки и высшего образования России, 630108, Новосибирск, Россия, ул. Плеханова, д. 10

Мелатонин – гормон, продуцируемый в центральной нервной системе (эпифизе) и периферических тканях (аппендиксе, поджелудочной железе, надпочечниках, тимусе, простате, яичниках, плаценте). Его секретируют клетки крови (тромбоциты, лимфоциты и эозинофилы) и эндотелий. Мелатонин обнаружен в тучных клетках, эндометрии, мозжечке, нейроэндокринных клетках воздухоносных путей, параганглиях, внутреннем ухе, печени, желчном пузыре, корковом слое почек. Ключевая роль гормона мелатонина определяется тем обстоятельством, что ритмам его продукции подчинены все эндогенные ритмы организма. Постоянно увеличивается число публикаций, указывающих на многогранность влияния мелатонина на организм и его активное участие во многих физиологических и патологических процессах. Имеются убедительные данные о том, что мелатонин участвует, практически, во всех процессах жизнедеятельности, контролируя многие функции организма – сон, деятельность иммунной, эндокринной, сердечно-сосудистой систем, проявлением чего служат универсальные терапевтические свойства мелатонина, которые, в свою очередь, определяются своеобразием его биологической роли. Поскольку мелатонин с легкостью проникает через биологические мембраны, он может оказывать свое действие практически во всех клетках. Некоторые из его эффектов рецепторно опосредованы, другие не зависят от рецепторов. Основные эффекты мелатонина связаны с действием на мембранные рецепторы MT1 и MT2. Они относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками. Эти рецепторы отвечают за хронобиологические эффекты и регуляцию циркадного ритма. MT1 и MT2 также представлены в периферических органах и клетках, и способствуют, например, в некоторой степени иммунологическим реакциям и вазомоторному контролю. MT1 в большей мере ответственны за вазоконстрикцию, в то время как MT2 вызывают вазодилатацию. Относительно недавно открыты ядерные рецепторы мелатонина ROR- $\alpha$ /RZR- $\beta$ . По-видимому, через них опосредуются многие иммуностимулирующие и противоопухолевые эффекты гормона мелатонина. Антиоксидантная функция мелатонина частично основана на рецепторном взаимодействии, некоторые антиоксидантные свойства в их обеспечении участия рецепторного аппарата не предполагают. В обзоре рассматриваются и обсуждаются имеющиеся в отечественной и зарубежной литературе сведения о потенциальной роли сиротских ядерных ретиноидных рецепторов подсемейства ROR/RZR в регуляции активности гормона шишковидной железы – мелатонина. Описаны механизмы взаимодействия рецептор-ДНК и известные коактиваторы, тканевые особенности экспрессии различных изоформ рецептора и ее регуляции. Проанализирован спектр вероятных мишеней для регуляции рецепторами, наиболее распространенными из которых являются лимфоидная и центральная нервная системы. Определены некоторые перспективы дальнейшего изучения мелатониновых рецепторов.

**Ключевые слова:** мелатонин; сиротские ядерные рецепторы ROR/RZR; эпифиз; защитное действие; профилактика; лечение

**Для цитирования:** Васендин Д.В. Ядерные рецепторы к мелатонину. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(2): 87-96.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.87-96

**Для корреспонденции:** Васендин Дмитрий Викторович, e-mail: vasendindv@gmail.com

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

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.01.2024

Принята к печати 25.04.2024

Опубликована 14.06.2024



**Vasendin D.V.****Nuclear melatonin receptors**

Siberian State University of Geosystems and Technologies,  
10 Plakhotnogo St., Novosibirsk, 630108, Russian Federation

Melatonin is a hormone produced in the central nervous system (pineal gland) and peripheral tissues (appendix, pancreas, adrenal glands, thymus, prostate, ovaries, placenta). It is secreted by blood cells (platelets, lymphocytes and eosinophils) and endothelium. Melatonin is found in mast cells, endometrium, cerebellum, neuroendocrine cells of the airways, paraganglia, inner ear, liver, gallbladder, cortical layer of the kidneys. The key role of melatonin is determined by the fact that endogenous rhythms of the body are subordinated to the rhythms of its production. The number of melatonin publications is constantly increasing, indicating the versatility of its effects resulting from its active participation in many physiological and pathological processes. There is convincing evidence that melatonin participates in almost all vital processes that control many body functions, including sleep and activities of the immune, endocrine, and cardiovascular systems. This is manifested by the universal therapeutic properties of melatonin, which, in turn, are determined by its peculiar biological role. Since melatonin easily traverses biological membranes, it can exert its effect in almost all cells. Some of its effects are receptor-mediated, others are receptor-independent. The main effects of melatonin are associated with its effect on the membrane receptors, MT1 and MT2, that belong to the family of receptors associated with G-proteins. These receptors are responsible for chronobiological effects and regulation of circadian rhythms. MT1 and MT2 are present in peripheral organs and cells, and they contribute, for example, to some extent to immunological reactions and vasomotor control. MT1 is more responsible for vasoconstriction, while MT2 causes vasodilation. The nuclear melatonin receptors, ROR- $\alpha$ /RZR- $\beta$ , have been discovered relatively recently. Apparently, many immune-stimulating and antitumor effects of melatonin are mediated through them. The antioxidant function of melatonin is partially based on receptor interaction, but some antioxidant properties do not require participation of the receptor apparatus. This review examines and discusses the information available in the Russian and international literature on the potential role of orphan nuclear retinoid receptors of the ROR/RZR subfamily in regulating the activity of the pineal hormone melatonin. The mechanisms of receptor-DNA interaction and known coactivators, tissue-specific features of the expression of various isoforms of the receptor, and its regulation are described. The array of probable targets for regulation by receptors is analyzed, the most common of which are the lymphoid and central nervous systems. The review identifies some prospects for further study of melatonin receptors.

**Keywords:** melatonin; orphan nuclear receptors ROR/RZR; pineal gland; protective effect; prevention; treatment

**For citation:** Vasendin D.V. Nuclear melatonin receptors. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(2): 87-96. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.02.87-96

**For correspondence:** **Dmitry V. Vasendin**, Cand. of Med. Sciences, associate Prof. of technosphere safety Department of the Federal state budgetary educational institution of higher education «Siberian state University of Geosystems and Technologies» of the Ministry of Science and higher Education of the Russian Federation, e-mail: vasendindv@gmail.com

**Information about the author:**

Vasendin D.V., <https://orcid.org/0000-0002-9503-6940>

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

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

Received 11.01.2024

Accepted: 25.04.2024

Published: 14.06.2024

**Введение**

Мелатонин — одно из древнейших биохимических веществ, регулирующие биологические ритмы живых организмов [1]. Он присутствует уже у одноклеточных организмов и растений. В организме позвоночных животных главный источник мелатонина (Mel) — эпифиз (шишковидная, или пинеальная) железа. В последующих исследованиях Mel был найден в сетчатке глаза, клетках кишечника, костного мозга, кожи. Вначале Mel считался гормоном, участвующим в синхронизации

механизмов циркадного ритма в организме. Позднее было установлено, что Mel принимает участие в регуляции сезонного и лунного циклов у человека и животных. Кроме того, он является тканевым фактором и одним из мощнейших антиоксидантов и регуляторов деятельности лимфоидной системы [2, 3]. Гормон обладает антидепрессивным, регулирующим двигательную активность, нейропротекторным, противовоспалительным, болеутоляющим, снижающим ар-

териальное давление действием, противоопухолевым и антиоксидантным действием. Mel участвует в регуляции синтеза половых гормонов: регулирует секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона нейронами гипоталамуса, который контролирует выработку лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона, стимулирует секрецию прогестерона, подавляет экспрессию рецептора эстрогена и активацию эстрогена [1, 2].

### **Мелатонин: биосинтез в эпифизе и обмен в организме**

Mel является основным гормоном, продуцируемым пинеалоцитами в эпифизе, представляющем собой структуру эпиталамуса и расположенном по срединной плоскости глубоко между полушариями. В настоящее время биосинтез Mel изучен достаточно подробно. По своей химической структуре он является биогенным амином, относящимся к классу индолов – 5-метокси-N-ацетилтриптамин. Начальным звеном в цепи синтеза мелатонина является незаменимая аминокислота триптофан. Затем происходят следующие превращения: триптофан → 5-гидрокситриптофан → 5-гидрокситриптамин (серотонин) → N-ацетилсеротонин → мелатонин (последние два превращения происходят при участии ферментов гидроксииндол-О-метилтрансферазы и N-ацетилтрансферазы) [4].

Эпифизом продуцируется примерно 80% циркулирующего в крови Mel, который не накапливается в органе, а сразу путем пассивной диффузии поступает из пинеалоцитов в кровоток. Mel имеет короткий период полураспада (около 30 мин) и быстро устраняется из кровотока. Он поступает в печень, где происходит его гидроксилирование и конъюгация с сульфатом и глюкуроновой кислотой с образованием 6-сульфатоксимелатонина (6-SOM, aMT6s), главного метаболита, который выводится с мочой. Процесс синтеза N-ацетил-5-метокситриптамина подчинен циркадианным колебаниям и зависит от уровня освещенности. Как и в других случаях с эндокринными железами, синтезируемый гормон не накапливается в эпифизе, а выбрасывается в кровяное русло, а затем в ликвор. В крови гормон связывается с альбумином. Так происходит транспортировка мелатонина и его защита от быстрого распада. Попав к клеткам-мишеням, мелатонин освобождается от комплекса с альбумином и связывается со специфическими мембранными рецепторами; благодаря наличию  $OCH_3$ -группы в пятом положении индольного кольца проникает в ядро клетки-мишени и таким образом воздействует непосредственно на геном. Полагают, что до 90% циркули-

рующего в кровотоке Mel метаболизируется в печени благодаря микросомальным цитохромам P-450 в результате гидроксилирования и деметилирования [5]. Процесс метаболизма Mel происходит также в головном мозге с образованием  $N_1$ -ацетил- $N_2$ -формил-5-метоксикинурамина, трансформирующегося в  $N_1$ -ацетил-5-метоксикинурамин. Последний обеспечивает защиту нервных клеток от перекисного окисления липидов и нейротоксинов [6] и независимо от исходного соединения эффективно участвует в поддержании митохондриального баланса как в норме, так и при патологии [7]. Особенностью продукции Mel эпифизом является выраженная суточная цикличность с пиками в ночное время. Уровень мелатонина в крови снижен у пожилых людей, курильщиков и у людей с избыточной массой тела [8, 9].

Универсальные защитные свойства Mel определяются, в первую очередь, антиоксидантной активностью, представляющей собой многофакторный феномен и описанный в научной литературе [3, 10]. В комплекс протективных возможностей этого гормона необходимо включить повышение энергетического потенциала клеток за счет увеличения процессов окислительного фосфорилирования в результате стабилизации митохондриальных мембран, его иммуномодулирующие свойства, а также способность ослаблять местные воспалительные процессы путем ограничения продукции провоспалительных цитокинов [11]. Мелатонин и его метаболиты оказались мощными антиоксидантами, и имеющиеся опубликованные данные показывают, что это действие может быть связано с рецепторно-независимой функцией гормона [7].

### **Морфофункциональная характеристика ретиноидных сиротских рецепторов ROR**

История исследований ядерных рецепторов охватывает более четырех десятилетий. Первыми идентифицированными такими белками были рецепторы стероидных гормонов, которые долгое время можно было обнаружить только по их способности избирательно и с высокой аффинностью связывать радиоактивно меченные гормональные лиганды. В 1986 г. была открыта структура кДНК и, соответственно, аминокислотная последовательность первого члена суперсемейства ядерных рецепторов. Всего пару лет спустя уже были известны аминокислотные последовательности рецепторов для всех стероидных гормонов, гормона экдизона, ответственного за линьку насекомых, дигидроксивитамина  $D_3$ , гормонов щитовидной железы и ретиноевой кислоты. Были начаты интенсивные исследования структурно-функциональной организации этих белков,

механизмов их взаимодействия с ДНК и их участия в регуляции транскрипции. Параллельно, основываясь на консервативности ДНК-связывающего домена гормональных рецепторов, появились исследования по клонированию новых членов семейства, лиганды которых были ранее неизвестны. Таким образом, такие белки были названы «сиротскими» рецепторами [12].

Первым выявленным и клонированным ядерным рецептором был рецептор эстрогена (ER), а первыми рецепторными белками были белки, связанные с рецептором эстрогена (ERR) [13]. Ядерные рецепторы с типичными доменными структурами и консервативными последовательностями, такие как рецепторы гормонов щитовидной железы и стеролов, представляют собой суперсемейство лиганд-зависимых факторов транскрипции [14]. В 1980-х годах, когда изучались новые члены этого суперсемейства, был идентифицирован ряд сиротских рецепторов с неизвестными лигандами, включая сиротский рецептор, связанный с ретиноевой кислотой (ROR).

Являясь лиганд-зависимым фактором транскрипции, ROR модулирует транскрипцию генов-мишеней путем связывания с элементами ответа ROR (RORE), присутствующими в генах-мишенях. ROR участвует в модуляции целого ряда важнейших физиологических процессов, включая развитие мозжечка и лимфоидной ткани, сетчатки, формирование костей, метаболизм липидов, циркадный ритм, окислительный стресс и подавление воспаления. Кроме того, ROR также является многообещающей терапевтической мишенью для аутоиммунных заболеваний, опухолей, ожирения, сахарного диабета и других тяжелых заболеваний. Таким образом, идентификация новых природных и синтетических лигандов ROR является отправной точкой для современных медико-биологических исследований, и необходимы дальнейшие исследования, целью которых является создание целевых методов лечения вышеупомянутых физиологических процессов и заболеваний [15].

Ряд уникальных функций Mel опосредуются его связыванием с мембранными рецепторами Mel 1-го или 2-го типа (MT1/MT2). Активация этих разных мембранных рецепторов может привести к противоположным результатам. Например, MT1-опосредованные сосудосуживающие эффекты мелатонина отличаются от MT2-опосредованных сосудорасширяющих

эффектов. Mel также функционирует через механизмы, не опосредованные рецепторами, такие как его мощная способность поглощать свободные радикалы [1, 2, 16]. Принято считать, что Mel имеет ядерные сайты связывания в дополнение к его мембраносвязанным рецепторам. В 1990-х годах появились сообщения о сайтах связывания Mel в очищенных клеточных ядрах, полученных из органов крысы (тимус, селезенка и печень). Исследования показали, что Mel связывает и активирует ядерные рецепторы ROR $\alpha$  и ROR $\beta$ , из чего последовал общий вывод, что ROR является ядерным рецептором мелатонина [13]. Это утверждение было частично подтверждено дальнейшими экспериментальными работами, результаты которых показали, что некоторые функции Mel опосредуются ROR. Кроме того, было показано, что Mel играет роль, подобную ROR-лиганду [17]. В другом исследовании сообщалось о совместной локализации и совместной иммунопреципитации Mel и ROR, подтверждая их взаимодействие, но так как предположение, что прямое связывание между ретиноидными Z-рецепторами  $\beta$  (RZR $\beta$ , теперь известными как ROR $\beta$ ) и Mel, не могло быть объективно экспериментально подтверждено, поэтому неоднократно высказывались сомнения относительно совместной модуляции Mel и ROR [13]. Результаты нескольких последующих исследований продемонстрировали, что Mel косвенно регулирует транскрипционную активность ROR через промежуточные этапы [18]. Кристаллографические данные свидетельствуют, что Mel и продукты его метаболизма не являются высокоаффинными лигандами для ROR. Поэтому научные дискуссии относительно вопроса, является ли ROR ядерным рецептором Mel, продолжают оставаться актуальными и своевременными.

Подсемейство ретиноидных Z-рецепторов RZR, или ретиноидных сиротских рецепторов ROR включает продукты трех генов: варианты сплайсинга ROR $\alpha$  (ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2, ROR $\alpha$ 3, RZR $\alpha$ ), которые отличаются N-концевым доменом, и RZR $\beta$ , и ROR $\gamma$ , которая содержит 523, 556, 548, 468, 459, и 560 аминокислотных остатков у людей соответственно, и которые имеют доменную организацию, типичную для ядерных рецепторов [12] (рис. 1). Структура включает N-концевой варибельный домен A/B с конститу-



Рис. 1. Доменная организация ядерных рецепторов (по А.Н. Смирнову).

Fig. 1. Domain organization of nuclear receptors (according to A.N. Smirnov).

тивной функцией трансактивации 1 (AF1), консервативный ДНК-связывающий домен С, вариабельный шарнирный домен D, относительно консервативный лиганд-связывающий домен E, содержащий лиганд-зависимую функцию трансактивации 2 (AF2), и необязательный короткий домен F. У мышей был обнаружен специфичный для тимоцитов вариант ROR $\gamma$  (ROR $\gamma$ -t) из 495 аминокислотных остатков. Хромосомно отображенные гены этих рецепторов (ROR $\alpha$ : человек: 15q21-q22, мышь: 9 36,0 см; ROR $\beta$  /RZR $\beta$ : человек: 9q22, мышь: 4; ROR $\gamma$ : человек: 1q21, мышь: 3 F2) имеют структуру, типичную для генов ядерных рецепторов, которая включает 11 экзонов, среди которых отдельные экзоны для каждого из двух «цинковых пальцев» ДНК-связывающего домена. Члены подсемейства обладают конститутивной транскрипционной активностью (положительной или отрицательной, в зависимости от промотора и типа клетки), и эта активность может быть усилена лигандом [12].

ROR в основном регулируют физиологические и патологические процессы, включая иммунитет, развитие (особенно нервной системы), циркадный ритм, опухолевый рост, клеточный метаболизм и окислительный стресс, которые также являются основными функциональными областями воздействия Mel. Более того, в различных исследованиях сообщалось, что ROR опосредуют функции Mel [19] и что Mel может регулировать транскрипционную активность ROR, усиливая транскрипцию генов-мишеней ROR [17]. Однако также было обнаружено, что ROR функционируют независимо от индуцированной Mel передачи сигналов [20].

RORa тесно связан с функцией Mel и активно участвует в его плеiotропных эффектах [21]. Ось «мелатонин-RORa» принимает участие в функционировании лимфоидной, репродуктивной и сердечно-сосудистой систем, а также в различных физиологических и патофизиологических процессах, таких как окислительный стресс, циркадные ритмы, развитие и онкогенез. В лимфоидной системе путь мелатонин-RORa имеет решающее значение для индукции дифференцировки Т-клеток, подавления аутоиммунных реакций и противовоспалительных функций. G.A. Garcia и соавт. продемонстрировали, что Mel зависит от RORa для подавления воспалительных реакций, связанных с ядерным фактором карра-В (NF- $\kappa$ B); более того, он способствует антиоксидантной защите во время лечения сепсиса [13]. Прогрессирование рассеянного склероза сдерживается путем ограничения дифференцировки клеток Th17 и стимуляции дифференцировки регуляторных Т (Tr1) клеток типа 1 через ось «Mel-RORa». При аутоиммунных заболеваниях Mel защищает

эндотелиальные клетки с помощью RORa-зависимого механизма, уменьшая экспрессию факторов воспаления и ингибируя миграцию макрофагов. Mel защищает сосуды от разрыва атеросклеротических бляшек посредством поляризации макрофагов, регулируемой RORa [13]. Что касается репродуктивной системы, путь «Mel-RORa» ингибирует апоптоз клеток Лейди-га (мезенхимальных стромальных клеток яичек) и способствует секреции тестостерона [22]. Кроме того, мелатонин уменьшает окислительный стресс во время гипертрофии сердца и сердечной/церебральной ишемии-реперфузии зависимым от RORa образом, оказывая благотворное влияние на патологическую гипертрофию и инфаркт миокарда, ишемический инсульт и диабетическую кардиомиопатию [17, 21]. Что касается подавления опухолевого роста с высокой степенью озлокачествления, RORa, как связанный с циркадным ритмом ген, способствует индуцированному Mel подавлению рака печени и колоректального рака. Кроме того, Mel ингибирует активацию звездчатых клеток печени посредством ROR $\alpha$ -опосредованного подавления 5-липоксигеназы [13]. ROR $\alpha$  также опосредует роль мелатонина в регуляции роста волос и уменьшении болевого синдрома. И Mel, и ROR $\alpha$  связаны с регуляцией костного и липидного обмена, секретацией инсулина и толерантностью к глюкозе, однако взаимосвязь этих эффектов еще предстоит выяснить [23].

Также показано, что некоторые функции ROR $\alpha$  не имеют отношения к передаче сигналов Mel. Так, ROR $\alpha$  имеет решающее значение для развития клеток Пуркине мозжечка. В результате у мышей, лишенных ROR $\alpha$ , наблюдается атрофия мозжечка и атаксия. Интересно, что сведений о влиянии Mel на развитие мозжечка в научной литературе отсутствуют [24].

ROR $\beta$  и его функции менее важны для передачи сигналов Mel. ROR $\beta$  сверхэкспрессируется в участках, которые регулируют циркадные ритмы, включая супрахиазматические ядра гипоталамуса (NSC) и эпифиз непосредственно. Колебания уровней мРНК ROR $\beta$  в эпифизе аналогичны колебаниям синтеза Mel. Тем не менее, показано, что ROR $\beta$  не участвует в циркадном ритме и сдвиге фазы, опосредуемом Mel, несмотря на ритмическую природу его экспрессии [13]. Более того, ROR $\beta$  играет, действительно, жизненно важную роль в формировании и функционировании сетчатки; он способствует пролиферации клеток-предшественников сетчатки, а также действует как ключевой фактор транскрипции для модуляции дифференцировки палочковых фоторецепторов. Кроме того, ROR $\beta$  играет решающую роль в перцептивных и когнитивных функциях, способствуя формированию слоистых

структур в коре головного мозга, которые образуются в результате дифференцировки нейронов. Сообщается, что ROR $\beta$  действует как маркер для нейронов в IV и V слоях коры головного мозга, а также в стволовой коре [20]. Мутации в гене ROR $\beta$  человека способствуют развитию эпилепсии и умственной отсталости. Отсутствие ROR $\beta$  у мышей также приводит к нарушениям походки и подавлению репродуктивных функций [13]. Однако ни в одном исследовании не сообщалось о вышеупомянутых функциях Mel. Интересно, что недавние данные *in vitro* и *in vivo* показали, что подавление или генетическое удаление ROR $\beta$  усиливает остеогенез и ограничивает резорбцию кости, следовательно, это может быть применено в качестве новой терапевтической мишени для лечения остеопороза. По совпадению, Mel, как сообщается, способствует остеогенной дифференцировке; таким образом, его также можно использовать для лечения остеопороза [25, 26]. ROR $\gamma$  опосредует несколько процессов, регулируемых Mel, и основные сообщения указывают на его участие в деятельности лимфоидной системы и подавлении опухолей. ROR $\gamma$  был предложен в качестве возможной новой мишени для лечения резистентности к инсулину, связанной с ожирением. В условиях диеты с высоким содержанием жиров у мышей ROR $\gamma$ -/- наблюдается меньшее накопление жира и снижение резистентности к инсулину. Известно, что Mel также может индуцировать апоптоз преадипоцитов, уменьшать количество висцерального жира и улучшать резистентность к инсулину. Хотя и Mel, и ROR $\gamma$  признаны потенциальными терапевтическими средствами при ожирении и диабете, о роли оси «мелатонин-ROR $\gamma$ » в ожирении и метаболизме глюкозы сведений явно недостаточно. Возможно, что ядерные рецепторы к Mel могут соучаствовать с мембранным рецепторным аппаратом в обеспечении и регуляции физиологических функций, так как Mel, помимо управления циркадными ритмами, является ключевым регулятором репродуктивных функций человека [27].

Механизм модуляции транскрипции с помощью ROR и REV-ERB. ROR и REV-ERB является лиганд-зависимым. Связывание лиганда вызывает конформационные изменения как в ROR, так и в REV-ERB. В результате привлекаются коактиваторы или корепрессоры, чтобы в конечном итоге усилить или подавить транскрипцию целевого гена. REV-ERB и ROR часто экспрессируются совместно, и оба специфически распознают RORE. Следовательно, ROR и REV-ERB конкурентно связываются с RORE, присутствующим в регуляторной области генов-мишеней, образуя взаимно антагонистические отношения. В большинстве случаев ROR рекрутирует коактиваторы и способствует

ет транскрипции генов, тогда как REV-ERB рекрутирует корепрессоры и ингибирует транскрипцию генов.

ROR зависит от лигандов для модуляции транскрипции. Такие лиганды классифицируются по их влиянию на транскрипционную активность рецептора, включая агонисты, антагонисты и обратные агонисты. Связывание агониста вызывает повышенный набор коактиваторов и усиливает транскрипцию генов-мишеней. Антагонисты не влияют на транскрипционную активность рецептора, но блокируют активацию, опосредованную агонистом. Однако обратные агонисты привлекают дополнительные ко-блокаторы для подавления базальной активности рецептора [15]. Механизм, лежащий в основе обратных агонистов, продолжает изучаться и может быть отнесен к затрудненному связыванию коактиваторов [28].

Рецепторы подсемейства ROR/RZR включают несколько рецепторов-сирот, для которых однозначно установлено существование природного регуляторного лиганда, причем этот лиганд имеет гормональную природу (т.е. выделяется в кровь и способен действовать удаленно от места его синтеза и выделения). Этот лиганд представляет собой Mel, основной эпифизарный продукт (рис. 2).

Константы связывания Mel с ядерными рецепторами и концентрация мелатонина, которая вызывает через эти рецепторы полумаксимальный эффект *in vitro* находятся в нано- или субнаномолярной области, аналогичной концентрации самого Mel в крови. Таким образом, экспрессируемый в трансфицированных клетках HeLa rat RZR $\beta$  связывал 2-йодомелатонин и с Kd = 5 нМ, в то время как полумаксимальная активация репортерного гена наблюдалась при концентрации гормона (EC<sub>50</sub>) 3 нМ. Согласно равновесному анализу, связывание 2-[<sup>125</sup>I] йодомелатонина с ядрами клеток из селезенки и тимуса крысы характеризовалось значениями Kd 0,068 и 0,102 нМ; согласно исследованиям кинетики связывания, эти значения составляли 0,166 и 0,537 нМ соответственно. Концентрации мелатонина в крови варьируются в широком диапазоне в зависимости от времени суток и сезона, например, у баранов от 0,14 до 2,3 нМ. Хотя ретиноидные гормоны дают название этому подсемейству рецепторов, они не являются лигандами этих рецепторов. Вопрос о том, различаются ли разные члены подсемейства ROR/RZR по своей специфичности связывания с гормонами, представляет значительный интерес. К сожалению, детальный анализ детерминант лиганда еще не был выполнен, а свойства связывания лигандов разных членов подсемейства подлежат сравнению [12]. Как известно, помимо внутриклеточной

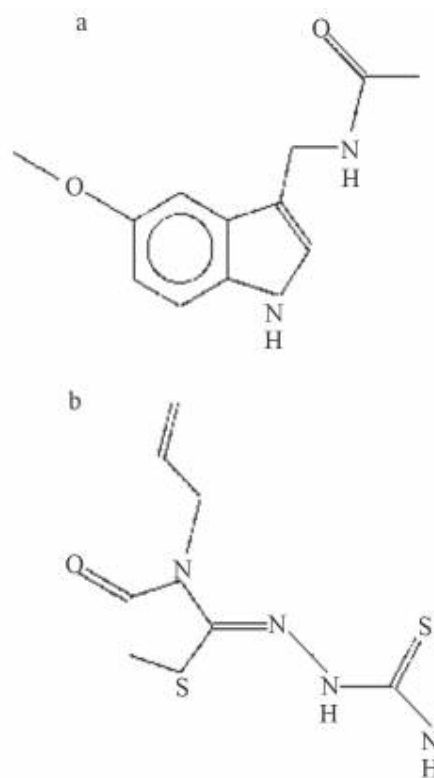
локализации пигмента меланина в коже (что отражено уже в названии гормона), которая опосредуется рецепторами мембранных гормонов, Mel играет значительную роль в регуляции полового созревания, проявляет антипролиферативную активность в ряде клеток, включая опухолевые клетки, служит ловушкой для свободных радикалов и действует многими другими способами. В экспериментах с трансфекцией RORE-содержащих репортерных конструкций, мелатонин и его аналоги, которые взаимодействуют преимущественно с ядерными рецепторами подсемейства ROR/RZR, значительно усиливали трансактивирующие эффекты этих рецепторов, хотя и не во всех исследованиях. Возможно, что стимуляция транскрипционной активности этих рецепторов, наблюдаемая в присутствии фетальной телячьей сыворотки, обусловлена действием Mel. Тем не менее, эксперименты с введением Mel *in vivo* еще не ответили на вопрос, служит ли Mel физиологическим регулятором активности рецепторов группы ROR/RZR и какие физиологические функции действительно регулируются Mel через эти рецепторы [12].

Открытие взаимодействия рецепторов группы ROR/RZR с Mel стимулировало проведение исследований, направленных на поиск других лигандов этих рецепторов. Благодаря использованию таких методических подходов, как анализ AlphaScreen, дифференциальная сканирующая флуориметрия, виртуальный скрининг, были идентифицированы и синтезированы новые лиганды ROR, что привело к созданию положительных модуляторов и новых терапевтических средств. Такие лиганды были обнаружены, в частности, среди препаратов группы тиазолидиндиона, обладающих противовоспалительной активностью. Была зарегистрирована высокая корреляция между способностью ряда тиазолидиндионов активировать ROR $\alpha$  и оказывать профилактическое и лечебное действие против адьювантно-индуцированного артрита у крыс. Однако, как справедливо отмечает А.Н. Смирнов, аналог мелатонина S20098, который активен с мембранными гормональными рецепторами, не обладает способностью активировать ROR $\alpha$  и предотвращать развитие артрита [12].

В настоящее время признанные пути, посредством которых Mel проявляет свои биологические эффекты, включают: (1) передачу сигналов мембранных рецепторов, связанных с G-белком (MT1, MT2), (2) передачу сигналов предполагаемых ядерных рецепторов (ROR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), (3) передачу сигналов устранения свободных радикалов, не связанных с рецепторами. В некоторых случаях Mel действует через ROR, а не через удаление свободных радикалов или мембранные рецепторы. Например, J. Kang и соавт. продемонстрировано,

что Mel подавляет пролиферацию клеток зубного сосочка крысы и одновременно усиливает их дифференцировку, в то время как лузиндол (конкурентный антагонист MT1/MT2) не смог обратить вспять действие Mel, что указывает на то, что вышеупомянутые функции Mel не зависят от мембранных рецепторов. Недавно они дополнительно продемонстрировали, что ROR опосредует усиление дифференцировки клеток зубного сосочка мелатонином. Это может быть доказательством в поддержку ROR как ядерного рецептора Mel [13, 29].

Считается, что ядерные рецепторы для Mel существуют из-за его способности проникать в клетки и обнаружения сайта ядерного связывания мелатонина. Еще в 1994 г. Беккер-Андре и соавт. обнаружили, что Mel связывается и активирует ядерный рецептор RZR $\beta$  (теперь известный как ROR $\beta$ ). Год спустя Визенберг и др. сообщили, что Mel также может связываться с ROR $\alpha$  и активировать его; более того, они иден-



**Рис. 2.** Лиганды для рецепторов ROR/RZR: а) мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин);

б) CGP 52608 (1-(3-аллил-4-оксотиазолидин-2-илиден)-4-метилтиосемикарбазон) (по А.Н. Смирнову).

**Fig. 2.** Ligands for ROR/RZR receptors: а) melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine); б) CGP 52608 (1-(3-allyl-4-oxothiazolidine-2-ylidene)-4-methylthiosemicarbazone) (according to A.N. Smirnov).

тифицировали новый синтетический лиганд ROR $\alpha$ , CGP 52608, который похож на Mel по функции. Кроме того, было продемонстрировано связывание 2-[<sup>125</sup>I] йодомелатонина ([<sup>125</sup>I] Mel) с очищенными клеточными ядрами в селезенке и тимусе, и это связывание Mel может быть заменено CGP 52608. Эти исследования подразумевали, что ядерным рецептором мелатонина может быть ROR. С момента этого первоначального открытия убеждение, что ROR служит ядерным рецептором для мелатонина, было широко принято многими исследователями [30]. Кроме того, многочисленные исследования показали, что ROR связан с Mel множеством прямых или косвенных способов, подтверждая предположение о том, что Mel является лигандом ROR.

Во-первых, ROR, по-видимому, связан с Mel по характеру его экспрессии. Мелатонин, который выделяется эпифизом ночью, регулирует циркадный ритм и цикл сна и бодрствования. Заметим, некоторые члены ROR также экспрессируются в эпифизе и в других ключевых участках, которые модулируют циркадные ритмы. Кроме того, все три члена ROR экспрессируются в циркадном колебательном паттерне [13]. Более того, ROR отвечает за модуляцию циркадных ритмов. ROR и REV-ERB образуют взаимно антагонистические отношения, в результате чего они конкурентно связываются с RORE в регуляторной области генов-мишеней. ROR способствует транскрипции целевого гена, тогда как REV-ERB подавляет ее. Экспрессия ROR и REV-ERB колеблется циркадно ритмично с противоположными тенденциями и динамически модулирует транскрипцию целевого гена BMAL1. Таким образом, BMAL1, ключевой фактор в контроле циркадных биологических часов млекопитающих, также экспрессируется в циркадном паттерне, что приводит к эффективному усилению циркадных колебаний [31].

Результаты некоторых исследований показали, что Mel и ROR имеют идентичные функции [32], и что ROR опосредует ряд функций Mel [19, 21, 22, 30]. Более того, установлено, что Mel оказывает дополнительное влияние на транскрипцию генов-мишеней ROR, о чем свидетельствуют исследования, охватывающие широкий спектр областей, включая иммунную регуляцию, подавление воспаления, оксидативный стресс, циркадные ритмы, развитие опухолей, размножение, рост волос, метаболизм костей и липидный обмен. И Mel, и ROR опосредуют метаболизм костей и липидов. Кроме того, Mel часто действует через посредничество ROR. Как упоминалось, ось «мелатонин-ROR» оказывает терапевтическое воздействие на системную красную волчанку, гиперлипидемию, инфаркт миокарда и ишемический инсульт посредством подавления воспаления и сни-

жения оксидативного стресса. Эта ось также подавляет развитие рака печени, желудка и толстой кишки, уменьшает невропатическую боль и замедляет прогрессирование фиброза печени. Кроме того, мелатонин также модулирует транскрипционную активность ROR. Например, выявлено, что лечение с помощью Mel значительно повышало экспрессию ROR $\alpha$ , подавляя экспрессию REV-ERB, способствуя усилению транскрипционной регуляции целевого гена ROR, BMAL1. Активация пути «мелатонин-ROR $\alpha$ » приводит к ингибированию NF- $\kappa$ B, что приводит к формированию противовоспалительного эффекта. Используя анализы репортерного гена люциферазы и анализы иммунопреципитации хроматина, продемонстрировано, что Mel способствует связыванию между ROR и IL10 RORE, тем самым активируя экспрессию IL10 и повышая регуляторную дифференцировку Т-клеток для облегчения течения рассеянного склероза. Было обнаружено, что ROR $\alpha$  играет регуляторную роль при диабетической кардиомиопатии и что добавление Mel оказывает SR1078-подобный (агонист ROR $\alpha$ ) эффект, стимулируя транскрипцию генов-мишеней ROR $\alpha$  и снижая выраженность диабетической кардиомиопатии [17]. L. Xu и соавт. установили, что в присутствии Mel экспрессия ROR $\alpha$  повышалась с последующим усилением трансактивации ROR $\alpha$  марганецзависимой супероксиддисмутазы для противодействия патологической гипертрофии миокарда [33]. Все эти данные подтверждают, что Mel усиливает транскрипционную активность ROR и дополнительно усиливает транскрипцию гена-мишени.

Что еще более важно, некоторые исследования показали, что Mel играет роль, сравнимую с определенной ROR лигандам. E.-J. Kim и соавт. продемонстрировали, что Mel по своим характеристикам сходен с сульфатом холестерина (агонистом ROR $\alpha$ ) и усиливает транскрипционную активность гена-мишени, индуцируемого гипоксией фактора 1 $\alpha$ . Сообщалось, что индуцируемая мелатонином транскрипция гена-мишени была сравнима с таковой в ответ на SR1078 (агонист ROR $\alpha$ ) [13, 17]. Мелатонин не только запускал транскрипционную активацию генов-мишеней ROR способом, напоминающим лиганды ROR, но также совместно локализовался и совместно иммунопреципитировался с ROR. Lardone и соавт. обнаружили совместную локализацию Mel и ROR в ядре Т-клеток Jurkat, а также их совместную иммунопреципитацию, что свидетельствует о взаимодействии между мелатонином и ROR.

Вопрос о том, является ли ROR ядерным рецептором для Mel или нет, до сих пор может считаться спорным. Было высказано предположение, что Mel косвенно регулирует транскрипционную активность ROR

или модулирует экспрессию ROR и его нижестоящие сигнальные пути на определенных этапах. Тем более, что молекулярное моделирование дополнительно показало, что Mel и его метаболиты не являются высокоаффинными лигандами ROR. Кроме того, некоторые считают, что Mel не может функционировать в качестве лиганда для ROR из-за значительных различий в структуре между Mel и его метаболитами и идентифицированными лигандами ROR (липиды, стероиды и ретиноиды) [34].

Таким образом, не достигнуто единого мнения о том, является ли ROR ядерным рецептором мелатонина. Как характер экспрессии, так и функции ROR в некоторой степени связаны с Mel. Некоторые исследования показали, что Mel работает подобно лигандам ROR, регулируя транскрипционную активность ROR [17]. Существуют исследования, в которых утверждается, что связывание и активация ROR $\beta$  мелатонином не воспроизводимы [35] и ставят под сомнение эти положения. Было подтверждено существование определенных промежуточных этапов, которые позволяют мелатонину косвенно модулировать экспрессию и функцию ROR. Поэтому можно уверенно утверждать, что исследования рецепторов мелатонина, по-видимому, находятся в «конце начала». Очевидно, что были проведены обширные исследования относительно выяснения механизмов действия Mel. Его свойства одинаково полезны, хотя не все конкретные механизмы к настоящему времени описаны. В дополнение к своим многочисленным положительным физиологическим свойствам Mel обладает необычайно высоким «профилем безопасности». Настало время продвинуть эти исследования на новый уровень, т.е. для более широкого тестирования возможностей его использования в клинических условиях [36]. Накапливающиеся данные свидетельствуют, что восстановление циркадных ритмов, а также добавление Mel в схемы лечения могут быть многообещающими терапевтическими стратегиями при различных заболеваниях. Полученные знания важны для понимания роли рецепторов мелатонина при нарушениях синтеза последнего в организме и для разработки фармацевтических препаратов, нацеленных на регулирование экспрессии мелатониновых рецепторов. Хотя в этом направлении предпринимаются некоторые шаги [37, 38], важно, чтобы были проведены многоцентровые, слепые, хорошо контролируемые исследования с четкой постановкой задач на всех этапах исследований, с использованием адекватных количеств мелатонина и с должной продолжительностью его введения, чтобы определить способность мелатонина отсрочить или предотвратить определенные заболевания

и/или их осложнения, что превосходят некоторые выводы из опубликованных результатов экспериментальных исследований отечественных и иностранных авторов. Это особенно важно, поскольку «профилактика всегда превосходит лечение» [39, 40].

### Литература

(п.п. 1; 3-11; 13-40 см. References)

2. Мичурина С.В., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю. Физиологические и биологические эффекты мелатонина: некоторые итоги и перспективы изучения. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2018; 104(3): 257–71.
12. Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы мелатонина. *Биохимия*. 2001; 66(1): 28–36.

### References

1. Vasendin D.V. Biomedical effects of melatonin: some results and prospects of studying. *Bulletin of the Russian Military medical Academy*. 2016; 55(3): 171–8.
2. Michurina S.V., Vasendin D.V., Ishchenko I.Yu. Physiological and biological effects of melatonin: some results and prospects of study. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2018; 104(3): 257–71. (In Russian)
3. Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Galano A., Zhou X.J., Bing X.B. Mitochondria: Central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. *Molecules*. 2018; 23(2): 509. <https://doi.org/10.3390/molecules23020509>
4. He C., Ma T., Shi J., Zhang Z., Wang J., Zhu K., et al. Melatonin and its receptor MT1 are involved in the downstream reaction to luteinizing hormone and participate in the regulation of luteinization in different species. *J. Pineal Res.* 2016; 61(3): 279–90. <https://doi.org/10.1111/jpi.12345>
5. Do Amaral F.G., Andrade-Silva J., Wilson M.T., Cipolla-Neto J. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*. 2019; 14(4): 293–300. <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1631158>
6. Cardinali D.P. Melatonin: clinical perspectives in neurodegeneration. *Front. Endocrinol.* 2019; 10: 480. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00480>
7. Michurina S.V., Letyagin A.Yu., Shurlygina A.V., Korolev M.A., Ishchenko I.Yu., Vasendin D.V., et al. *Hepato-immune-epiphysis axis of inter system interactions. Melatonin and structural-functional changes in the liver and immune system during obesity and diabetes mellitus type 2*. Novosibirsk: «Manuscript Press»; 2019.
8. Lin P.H., Tung Y.T., Chen H.Y., Ko-Chieh H. Melatonin activates cell death programs for the suppression of uterine leiomyoma cell proliferation. *J. Pineal Res.* 2020; 68: e12620
9. Zhao D., Yu Y., Shen Y., Liu Q., Zhao Z., Sharma R., et al. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary history in animals and plants. *Front. Endocrinol.* 2019; 10: 249. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00249>
10. Bocheva G., Slominski R.M., Janjetovic Z., Tae-Kang K. Protective role of melatonin and its metabolites in skin aging. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(3): 1238. <https://doi.org/10.3390/ijms23031238>
11. Morvaridzadeh M., Sadeghi E., Agah S. Effect of melatonin supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and



- meta-analysis. *Pharmacological Research*. 2020; 161: 105210. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105210>
12. Smirnov A.N. Nuclear melatonin receptors. *Biokhimiya*. 2001; 66(1): 28–36. (In Russian)
  13. Ma H., Kang J., Fan W., He H., Huang F. ROR: Nuclear receptor for melatonin or not? *Molecules*. 2021; 26: 2693. <https://doi.org/10.3390/molecules26092693>
  14. Evans R.M., Mangelsdorf D.J. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell*. 2014; 157: 255–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
  15. Ladurner A., Schwarz P.F., Dirsch V.M. Natural products as modulators of retinoic acid receptor-related orphan receptors (RORs). *Nat. Prod. Rep.* 2021; 38: 757. <https://doi.org/10.1039/D0NP00047G>
  16. Liu L., Labani N., Cecon E., Jockers R. Melatonin target proteins: too many or not enough? *Front. Endocrinol.* 2019; 10: 791. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00791>
  17. Zhao Y., Xu L., Ding S., Lin N., Ji Q., Gao L., et al. Novel protective role of the circadian nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor- $\alpha$  in diabetic cardiomyopathy. *J. Pineal Res.* 2017; 62. <https://doi.org/10.1111/jpi.12378>
  18. Han D., Wang Y., Chen J., Yabin W. Activation of melatonin receptor 2 but not melatonin receptor 1 mediates melatonin-conferred cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Pineal Res.* 2019; 67: e12571. <https://doi.org/10.1111/jpi.12571>
  19. Huang H., Liu X., Chen D., Yikang L., Li J., Du F., et al. Melatonin prevents endothelial dysfunction in SLE by activating the nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor- $\alpha$ . *Int. Immunopharmacol.* 2020; 83: 106365. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106365>
  20. Clark E.A., Rutlin M., Capano L., Aviles S., Saadon J.R. Taneja P., et al. Cortical ROR is required for layer 4 transcriptional identity and barrel integrity. *eLife*. 2020; 9: e52370. <https://doi.org/10.7554/eLife.52370>
  21. Zang M., Zhao Y., Gao L., Zhong F., Qin Z., Tong R., et al. The circadian nuclear receptor ROR negatively regulates cerebral ischemia–reperfusion injury and mediates the neuroprotective effects of melatonin. *BBA Mol. Basis Dis.* 2020; 1866: 165890. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165890>
  22. Li Z., Zhao J., Liu H., Wang H., Lu W. Melatonin inhibits apoptosis in mouse Leydig cells via the retinoic acid-related orphan nuclear receptor  $\alpha$ /p53 pathway. *Life Sci.* 2020; 246: 117431. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117431>
  23. Min H.Y., Son H.E., Jang W.G. Estradiol-induced ROR expression positively regulates osteoblast differentiation. *Steroids*. 2019; 149: 108412. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.05.004>
  24. Yasui H., Matsuzaki Y., Konno A., Hirai H. Global knockdown of retinoid-related orphan receptor in mature purkinje cells reveals aberrant cerebellar phenotypes of spinocerebellar ataxia. *Neuroscience*. 2020; 462: 328–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.04.004>
  25. Aquino-Martinez R., Farr J.N., Weivoda M.M., Negley B.A., Onken J.L., Thicke B.S., et al. miR-219a-5p regulates Ror $\beta$  during osteoblast differentiation and in age-related bone loss. *J. Bone Miner. Res.* 2019; 34: 135–44. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3586>
  26. Xu L., Zhang L., Wang Z., Li C., Li S., Li L., et al. Melatonin suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis and promotes osteoblastogenesis by inactivating the NLRP3 inflammasome. *Calcif. Tissue Int.* 2018; 103: 400–10. <https://doi.org/10.1007/s00223-018-0428-y>
  27. Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Archipov S.A., Cherepanova M.A., Vasendin D.V., Zavjalov E.L., et al. Apoptosis in the liver of male DB/DB mice during the development of obesity and type 2 diabetes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(4): 435–40. <https://doi.org/10.18699/VJ20.43-o>
  28. Kallen J., Izaac A., Be C., et al. Structural States of ROR $\alpha$ : X-ray elucidation of molecular mechanisms and binding interactions for natural and synthetic compounds. *ChemMedChem*. 2017; 12: 1014–21. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700278>
  29. Kang J., Chen H., Zhang F., Yan T., Fan W., Jiang L., et al. ROR $\alpha$  regulates odontoblastic differentiation and mediates the pro-odontogenic effect of melatonin on dental papilla cells. *Molecules*. 2021; 26: 1098. <https://doi.org/10.3390/molecules26041098>
  30. Farez M.F., Calandri I.L., Correale J., Quintana F.J., et al. Anti-inflammatory effects of melatonin in multiple sclerosis. *Bioessays*. 2016; 38: 1016–26. <https://doi.org/10.1002/bies.201600018>
  31. Gooley J.J. Circadian regulation of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 2016; 75: 440–50. <https://doi.org/10.1017/S0029665116000288>
  32. Ferlazzo N., Andolina G., Cannata A. et al. Is Melatonin the cornucopia of the 21st century? *Antioxidants*. 2020; 9: 1088. <https://doi.org/10.3390/antiox9111088>
  33. Xu L., Su Y., Zhao Y., Sheng X., Tong R., Ying X., et al. Melatonin differentially regulates pathological and physiological cardiac hypertrophy: Crucial role of circadian nuclear receptor ROR signaling. *J. Pineal Res.* 2019; 67: e12579. <https://doi.org/10.1111/jpi.12579>
  34. Slominski A.T., Kim T.K., Takeda Y., Janjetovic Z., Brozyna A.A., Skobowiat C., et al. ROR $\alpha$  and ROR are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxyand 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J.* 2014; 28: 2775–89. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242040>
  35. Becker-André M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H., et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 28531–4.
  36. Hajam Y.A., Rai S. Melatonin and insulin modulates the cellular biochemistry, histoarchitecture and receptor expression during hepatic injury in diabetic rats. *Life Sci.* 2019; 239: 117046. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117046>
  37. Morvaridzadeh M., Sadeghi E., Agah S. Effect of melatonin supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacological Research*. 2020; 161: 105210. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105210>
  38. Somalo-Barranco G., Serra C., Lyons D., Piggins H.D., Jockers R., Llebaria A. Design and validation of the first family of photo-activatable ligands for melatonin receptors. *J. Med. Chem.* 2022; 65: 11229–40. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00717>
  39. Liu J., Clough S.J., Hutchinson A.J., Adamah-Biassi E.B., Popovska-Gorevski M., Dubocovich M.L. MT1 and MT2 melatonin receptors: A therapeutic perspective. *Pharm. Toxicol.* 2016; 56: 361–83.
  40. Nikolaev G., Robeva R., Konakchieva R. Membrane melatonin receptors activated cell signaling in physiology and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(1): 471. <https://doi.org/10.3390/ijms23010471>

**Сведения об авторе:**

**Васендин Дмитрий Викторович**, канд. мед. наук, доцент каф. техносферной безопасности ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет геосистем и технологий» Минобрнауки России.