

**PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY**

3

Vol. 68

2024

ISSN 0031-2991

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Издается с 1957 г.



**В.В. Пашутин
(1845 – 1901)**

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 05.09.2024
Подписано к печати 16.09.2024
Опубликовано 27.09.2024

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 № 3. 1–94.

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



9 770031 299001

ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»
Общество патофизиологов

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Основан в 1957 г.

Том 68 № 3 · 2024
Июль–Сентябрь

Главный редактор:

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

Заместители главного редактора:

Л.И. Колесникова, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «НЦПЗСРЧ», Иркутск*
С.Г. Морозов, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «НИИОПП», Москва*

Ответственный секретарь:

Н.С. Гурко, *к.м.н., ФГБНУ «НИИОПП», Москва*

Редакционная коллегия:

В.М. Баранов, *акад. РАН, д.м.н., проф., «ФМБЦ им. А.И. Бурназяна», ФМБА, Москва*
Т.Д. Власов, *д.м.н., проф., «ПСПБГМУ им. И.П. Павлова», Санкт-Петербург*
С.В. Грачев, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Москва*
И.С. Гушин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., МГНЦГ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва*
М.А. Даренская, *д.м.н., проф., ФГБНУ «НЦПЗСРЧ», Иркутск*
Г. Дауни, *д.б.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*
С.И. Колесников, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГОУ ВПО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва*
А.А. Кубатиев, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «НИИОПП», Москва*
А.В. Кубышкин, *д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь*
Д.А. Кудлай, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., МГНЦГ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва*
Н.Е. Кушлинский, *акад. РАН, д.м.н., проф., «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», Москва*
П.Ф. Литвицкий, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», 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 им. Н.И. Пирогова», Москва*
Р. Сьюелл, *д.б.н., проф., Университет Кардиффа, Кардифф, Великобритания*
О.В. Шамова, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург*
Б.Г. Юшков, *чл.-корр. РАН, ФГБУН «ИИФ УрО» РАН, Екатеринбург*
К.Н. Ярыгин, *чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва*

Редакционный совет:

И.Н. Боголепова, *акад. РАН, д.м.н., проф., «НЦ неврологии», Москва*
Ю.Ю. Бяловский, *д.м.н., проф., РязГМУ, Рязань*
О.И. Гурина, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., «НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского», Москва*
О.М. Драпкина, *акад. РАН, д.м.н., проф., «НМИЦ терапии и профилактической медицины», Москва*
А.Д. Дурнев, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва*
В.П. Куликов, *д.м.н., проф., АМИЦДО, Барнаул*
В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ЯГМУ, Ярославль*
Д.Б. Никитюк, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва*
В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*
М.В. Осиков, *д.м.н., проф., ЮУГМУ, Челябинск*
Д.А. Сычев, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБОУ ДПО «РМАНПО», Москва*
А.А. Чурин, *д.м.н., Томский НИМЦ РАН «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск*
В.Н. Шабалин, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «НИИОПП», Москва*

**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 technol-
ogy 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 05.09.2024
Signed for publication on 16.09.2024
Published on 27.09.2024

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

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter
2024. Vol. 68. No 3. 1–94.

Reprinting and use journal materials in any form, including electronic media, only possible with written permission of the publisher. The responsibility for the content of advertising publications is on the advertisers exclusively.

© IE Irishkin Dmitry Andreevich, 2024.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Institute of General Pathology and Pathophysiology
Russian Society of Pathophysiologists

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

*Pathological physiology and experimental therapy
Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 68 № 3 · 2024

July–September

Editor-in-chief:

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

Deputy chief editors:

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

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

Executive editor:

N.S. Gourko, *PhD, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

Editorial Board:

V.M. Baranov, *Acad. RAS, DSc, Prof., A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the FMBA of Russia, Moscow, Russia*

T.D. Vlasov, *First St. Petersburg State Medical University named after: acad. I.P. Pavlova, St. Petersburg, Russia*

S.V. Grachev, *Acad. RAS, DSc, Prof., First Mos. State Med. Univ., Moscow, Russia*

I.S. Gushchin, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Institute of Immunology, Moscow, Russia*

M.A. Darenskaya, *DSc, Prof., Scientific Center for Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russia*

H. Downey, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

S.I. Kolesnikov, *Acad. RAS, DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

A.A. Kubatiev, *Acad. RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

A.V. Kubyshekin, *V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

D.A. Kudlay, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Institute of Immunology, Moscow, Russia*

N.E. Kushlinskiy, *National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin, Moscow, Russia*

P.F. Litvitskiy, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., First Mos. 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., Pirogov National Research Med. Univ., Moscow, Russia*

R. Sewell, *PhD, Prof., Cardiff University, Cardiff, UK*

O.V. Shamova, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

B.G. Yushkov, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the RAS, Ekaterinburg, Russia*

K.N. Yarygin, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich, Moscow, Russia*

Advisory Committee:

I.N. Bogolepova, *acad. Acad. RAS, DSc, Prof., Scientific Center of Neurology, Moscow, Russia*

Yu.Yu. Byalovskiy, *DSc, Prof., Ryazan State Med. University, Ryazan, Russia*

O.I. Gurina, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., NMIC of Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Moscow*

O.M. Drapkin, *acad. RAS, MD, Prof., NMIC of Therapy and Preventive Medicine, Moscow*

A.D. Durnev, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., FRC of original and promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow*

V.P. Kulikov, *DSc, Prof., Altai Medical Inst. of Postgraduate Education, Barnaul, Russia*

V.P. Mikhailov, *DSc, Prof., Yaroslavl State Med. University, Yaroslavl, Russia*

D.B. Nikityuk, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., FRC Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia*

V.G. Ovsyannikov, *DSc, Prof., Rostov State Med. University, Rostov-na-Donu, Russia*

M.V. Osikov, *DSc, Prof., South Ural State Med. University, Chelyabinsk, Russia*

D.A. Sychev, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., FGBOU DPO «RMANPO», Moscow, Russia*

A.A. Churin, *DSc, Tomsk National Research Medical Center «Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg», Tomsk, Russia*

V.N. Shabalin, *acad. RAS, MD, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Филиппова Е.А., Лукина С.С., Бурдённый А.М., Пронина И.В., Логинов В.И., Аржанухина Н.А., Казубская Т.П., Брага Э.А.** Ко-метилирование в согласованной регуляции группы генов апоптоза при раке молочной железы. 4
- Галимова Э.Ф., Галимов К.Ш., Громенко И.Д., Галимов Ш.Н., Усова С.Д., Литвицкий П.Ф.** Взаимосвязь фрагментации ДНК сперматозоидов и тератозооспермии при идиопатическом бесплодии. 15
- Курашова Н.А., Дашиев Б.Г., Колесников С.И., Лабыгина А.В., Колесникова Л.И.** Окислительный стресс и показатели сперматогенеза у мужчин с идиопатическим бесплодием до и после приема этилметилгидроксипиридин малата. 23
- Степанов Е.А., Баясхаланова Ц.Б., Фефелова Е.В., Степанов А.В., Терешков П.П., Степанова М.О., Цыбиков Н.Н.** Белок S100 и метаболиты триптофана в развитии ревматоидного артрита. 31
- Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Шойбонов Б.Б., Порошина А.С., Деморжи М.С., Карганов М.Ю.** Стресс разлуки с матерью в раннем возрасте влияет на нейроиммуноэндокринные характеристики крыс зависимым от пола и возраста образом. 37
- Алхусейн-Кулягинова М.С., Додохова М.А., Воронова О.В., Котиева Е.М., Котиева В.М., Васильев И.В., Климова Л.Ю., Гулян М.В., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р., Котиева И.М.** Патоморфологическая оценка неспецифического токсического воздействия гибридных оловоорганических соединений в метрономном режиме введения. 54
- Маркова К.В., Торопова А.А., Разуваева Я.Г., Оленников Д.Н.** Влияние экстракта сухого *Klasea centauroides* (L.) Cassini на энергетические и антиоксидантные процессы в головном мозге при длительной алкогольной интоксикации. 68
- Бабенко А.Н., Крепкова Л.В., Лемясева С.В., Кузина О.С., Боровкова М.В.** Гепатопротекторное действие цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) при интоксикации крыс сулемой. 75

ОБЗОРЫ

- Геворкян Н.М.** Альтернативные возможности коррекции и профилактики наследственных и врожденных патологий путем перепрограммирования клеток *in vivo* с помощью суммарных РНК лимфоцитов здоровых особей. 85

ORIGINAL ARTICLES

- Filippova E.A., Lukina S.S., Burdennyu A.M., Pronina I.V., Loginov V.I., Arzhanukhina N.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A.** Co-methylation in the concerted regulation of a group of apoptotic genes in breast cancer
- Galimova E.F., Galimov K.Sh., Gromenko I.D., Galimov Sh.N., Usova S.D., Litvitskiy P.F.** The relationship of sperm DNA fragmentation and teratozoospermia in idiopathic infertility
- Kurashova N.A., Dashiev B.G., Kolesnikov S.I., Labygina A.V., Kolesnikova L.I.** Oxidative stress and parameters of spermatogenesis in men with idiopathic infertility before and after the treatment with ethylmethylhydroxypyridine malate
- Stepanov E.A., Bayaskhalanova Ts.B., Fefelova E.V., Stepanov A.V., Tereshkov P.P., Stepanova M.O., Tsybikov N.N.** S100 protein and tryptophan metabolites in rheumatoid arthritis
- Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B., Shoibonov B.B., Poroshina A.S., Demorzhi M.S., Karganov M.Yu.** Stress of early maternal separation affects the neuroimmunoendocrine characteristics of rats in a sex- and age-dependent manner
- Alkhusein-Kulyaginova M.S., Dodokhova M.A., Voronova O.V., Kotieva E.M., Kotieva V.M., Vasiliev I.V., Klimova L.Yu., Gulyan M.V., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R., Kotieva I.M.** Pathomorphological assessment of non-specific toxic effect of hybrid organotin compounds in metronomic mode of administration
- Markova K.V., Toropova A.A., Razuvaeva Ya.G., Olennikov D.N.** The neuroprotective effect of *Klasea centauroides* (L.) Cassini dry extract in long-term alcohol intoxication
- Babenko A.N., Krepkova L.V., Lemyaseva S.V., Kuzina O.S., Borovkova M.V.** Hepatoprotective effect of chicory (*Cichorium intybus* L.) in rat of intoxication with mercury (II) chloride

REVIEWS

- Gevorkyan N.M.** Alternative possibilities for correction and prevention of hereditary and congenital pathologies by reprogramming cells *in vivo* using total RNA of lymphocytes from healthy individuals

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092+575:599

Филиппова Е.А.¹, Лукина С.С.¹, Бурдённый А.М.^{1,2}, Пронина И.В.^{1,3},
Логинов В.И.^{1,4}, Аржанухина Н.А.⁵, Казубская Т.П.⁵, Брага Э.А.^{1,4}

Ко-метилование в согласованной регуляции группы генов апоптоза при раке молочной железы

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

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

³ФГБОУ «Государственный университет просвещения»,
141014, Московская обл., Мытищи, Россия, ул. Веры Волошиной, д. 24;

⁴ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова,
115478, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23

Актуальность. Согласно последним данным мировой статистики, рак молочной железы (РМЖ) опередил рак легких по заболеваемости среди женщин. Эпигенетические изменения возникают на самых ранних этапах трансформации нормальной клетки в опухоль и позволяют заранее предсказать возможность возникновения РМЖ, что отражает преимущества эпигенетики в предупреждении предраковых заболеваний и ранней диагностике. Кроме того, эпигенетические модификации обратимы, а генетическая регуляция необратима, поэтому для лечения РМЖ более привлекательным является разработка препаратов, направленных на обратимые процессы.

Цель исследования – определение роли aberrантно метилирования генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* в прогрессии РМЖ и роли ко-метилования и ко-экспрессии в совместной регуляции и функциях.

Методика. Образцы опухолей молочной железы собраны и клинически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Высокмолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* проводился с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной МС-ПЦР в реальном времени готовой реакционной смесью qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Статистический анализ уровней экспрессии выполнен в программной среде R с применением непараметрического U теста Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполняли с использованием метода ранговой корреляции Спирмена и рассчитывали уровень его значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные об экспрессии и метилировании исследуемых генов при РМЖ проанализированы также по базам данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>) и GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), о процессах и сигнальных путях – по базе ncPath (<http://ncpath.pianlab.cn/#/Home>).

Результаты. Определены aberrантно метилированные гены *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1* при РМЖ. Показано значимое ($p < 0,05$) увеличение уровня метилирования на более поздней стадии (III) по сравнению с более ранними стадиями (I-II) РМЖ и с увеличением размера опухоли для генов *APAF1*, *BAK1*, *DAPK1*, а также при наличии метастазов в лимфатических узлах для генов *APAF1* и *BIM*. Впервые определены ко-метилируемые гены системы апоптоза при РМЖ: *BCL2* – *BIM*, *APAF1* – *DAPK1*, *APAF1* – *BIM*, *APAF1* – *BCL2* ($r_{\{0,30-0,46\}}$; $p < 0,05$).

Заключение. Изучение молекулярных механизмов развития и прогрессии РМЖ, а также новое представление о паттернах метилирования генов системы апоптоза приблизит к открытию новых маркеров и перспективных мишеней для таргетной терапии РМЖ.

Ключевые слова: белоккодирующие гены; апоптоз; метилирование ДНК; рак молочной железы

Для цитирования: Филиппова Е.А., Лукина С.С., Бурдённый А.М., Пронина И.В., Логинов В.И., Аржанухина Н.А., Казубская Т.П., Брага Э.А. Ко-метилование в согласованной регуляции группы генов апоптоза при раке молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(3): 4-14.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.4-14

Участие авторов: Филиппова Е.А. – концепция и структура статьи, статистическая обработка полученных данных; Лукина С.С., Пронина И.В. – ответственные за экспериментальные данные; Бурденный А.М. – обработка полученных данных; Логинов В.И. – подготовка иллюстративного материала; Аржанухина Н.А. – сбор клинических образцов; Казубская Т.П. – сбор клинических образцов; Брага Э.А. – участие в обсуждении и редактировании статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: *Филиппова Елена Александровна*, e-mail: p.lenyxa@yandex.ru;
Бурденный Алексей Михайлович, e-mail: burdennyu@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 22-75-00132).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.05.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

**Filippova E.A.¹, Lukina S.S.¹, Burdennyu A.M.^{1,2}, Pronina I.V.^{1,3},
Loginov V.I.^{1,4}, Arzhanukhina N.A.⁵, Kazubskaya T.P.⁵, Braga E.A.^{1,4}**

Co-methylation in the concerted regulation of a group of apoptotic genes in breast cancer

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8 Baltijskaya Str., Moscow, 125315, Russian Federation;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS,
4 Kosygin st., Moscow, 119334, Russian Federation;

³State University of Education,
24 Very Voloshinoy str., Mytishchi, Moscow oblast, 141014, Russian Federation;

⁴Research Centre for Medical Genetics,
1 Moskvoreche str., Moscow, 115522, Russian Federation;

⁵N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology The Ministry of Health of Russia,
23 Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russian Federation

Background. According to the latest global statistics, breast cancer (BC) has surpassed lung cancer in the incidence among women. Epigenetic changes at the earliest stages of normal cell transformation into tumor cells allow us to predict the possibility of breast cancer in advance, which reflects the advantages of epigenetics in preventing precancerous diseases and early diagnosis. In addition, epigenetic modifications are reversible, while the genetic regulation is irreversible, so the development of drugs aimed at reversible processes is more attractive for the treatment of BC.

The aim of the study was to determine the role of aberrant methylation of the apoptosis-related genes, APAF1, BAK1, BAX, BCL2, BIM, and DAPK1, in the BC progression and the role of co-methylation and co-expression in the co-operative regulation and functions.

Methods. Breast tumor samples were collected and clinically characterized at the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. High-molecular DNA was isolated from the tissue using a standard method. The level of methylation of the APAF1, BAK1, BAX, BCL2, BIM, and DAPK1 genes was assessed by bisulfite DNA conversion and quantitative real-time MS-PCR with the ready-made reaction mixture qPCRmix-HS SYBR (Eurogen). Statistical analysis of the expression was performed in the R software environment using the nonparametric Mann-Whitney U test. Correlation analysis was performed with the Spearman rank correlation test, and the significance level was calculated. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Expression and methylation parameters of the studied genes were also analyzed in BC using the MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>) and GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) databases, and data on processes and signaling pathways were analyzed using the ncPath database (<http://ncpath.pianlab.cn/#/Home>).

Results. Aberrantly methylated APAF1, BAK1, BAX, BIM, DAPK1 genes were identified in BC. A significant ($p < 0.05$) increase in the methylation level was shown at a later stage (III) compared with earlier stages (I-II) of BC; with larger tumor sizes for the APAF1, BAK1, DAPK1 genes; and in the presence of metastases in the lymph nodes for the APAF1 and BIM genes. For the first time, co-methylated apoptosis-related genes were identified in BC: BCL2 – BIM, APAF1 – DAPK1, APAF1 – BIM, and APAF1 – BCL2 ($rs\{0.30 - 0.46\}$; $p < 0.05$).

Conclusion. Studying molecular mechanisms of BC development and progression, as well as a new insight into the methylation patterns of apoptosis-related genes will bring us closer to the discovery of new markers and promising targets for targeted therapy of BC.

Keywords: protein-coding genes; apoptosis; DNA methylation; breast cancer

For citation: Filippova E.A., Lukina S.S., Burdennyu A.M., Pronina I.V., Loginov V.I., Arzhanukhina N.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A. Co-methylation in the coordinated regulation of a group of apoptosis genes in breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 4-14. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.4-14

Contribution of the authors: Filippova E.A. – concept and structure of the article and statistical processing of the obtained data; Lukina S.S., Pronina I.V. – responsible for the experimental data; Burdenny A.M. – processing of the obtained data; Loginov V.I. – preparation of illustrative material; Arzhanukhina N.A. – collection of clinical samples; Kazubskaya T.P. – collection of clinical samples; Braga E.A. – participation in the discussion and editing of the article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Filippova Elena Aleksandrovna*, e-mail: p.lenyxa@yandex.ru;
Burdenny Alexey Mikhailovich, e-mail: burdenny@gmail.com

Information about the authors:

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

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

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

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

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

Arzhanukhina N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1928-5010>

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

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

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 22-75-00132).

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

Acknowledgments. The authors thank the staff of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology for collecting and clinical and histologically characterizing breast cancer samples.

Received 07.05.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Согласно данным мировой статистики, рак молочной железы (РМЖ) опередил рак легких по заболеваемости среди женщин в мире и в России [1]. Число новых случаев РМЖ за 2022 г. во всем мире составляет 2,3 млн, что соответствует 23,8% всех новых случаев рака у женщин, а смертность от РМЖ достигла 700 тыс случаев за 2022 г. [1]. Современная терапия больных РМЖ включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, гормональную терапию, химиотерапию и таргетную терапию, но у 30% больных по-прежнему наблюдается рецидив опухоли или отдаленные метастазы [2]. Ввиду чего, изучение молекулярных механизмов РМЖ и поиск новых потенциальных терапевтических мишеней представляется крайне актуальной задачей.

Гены системы апоптоза играют ключевую роль в функционировании клетки, корректная работа системы регуляции генов апоптоза отвечает за своевременное распознавание «ошибок» в работе клетки с последующим ее самоуничтожением. Однако, в силу различных aberrаций происходит нарушение баланса и функций проапоптозных и антиапоптозных генов, что приводит к нарушению работы отлаженной системы программируемой клеточной гибели. Одним из таких факторов выступает метилирование промоторных CpG-островков генов системы апоптоза, что приводит к aberrантной экспрессии генов апоптоза и, как следствие, к возникновению и прогрессии рака.

Рак является многофакторным заболеванием, сочетающим в себе генетические и эпигенетические нару-

шения. Эпигенетические изменения возникают на самых ранних этапах трансформации нормальной клетки в опухолевую и позволяют заранее предсказать возможность возникновения РМЖ, что отражает преимущества эпигенетики в предупреждении предраковых заболеваний и ранней диагностике. Кроме того, эпигенетические модификации обратимы, а генетическая регуляция необратима, поэтому для лечения РМЖ более привлекательным является разработка препаратов, направленных на обратимые процессы [3]. Предлагается использование ферментов, связанных с эпигенетической регуляцией, в качестве мишеней для изменения эпигенетической динамики и восстановления общей экспрессии генов в составе комплексной терапии РМЖ [4]. Примечательно, что эпигенетические модификации сложны и разнообразны, и имеют синергетический эффект.

Гиперметилованию чаще всего подвержены гены-супрессоры опухолей, однако эта модификация найдена также для генов репарации ДНК, апоптоза, регуляции клеточного цикла, роста клеток, гомеостаза и адгезии [5–7]. Считается, что статус метилирования ДНК может иметь значение как в качестве диагностического, так и в качестве прогностического маркера, включая ответ на терапию. К важным регуляторам апоптоза относятся Death-associated protein kinase 1 (DAPK1) и Apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), об инактивации которых путем гиперметилирования их генов сообщено при разных типах рака. Гиперметилование гена *DAPK1* показано при раке желудка и шейки матки [8, 9]. Отмечается,

что гиперметилирование гена *APAF1* может способствовать прогрессированию аденокарциномы поджелудочной железы посредством влияния на протекание периневральной инвазии [10].

Ранее нами были получены данные о гиперметилировании пяти генов системы апоптоза *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM/BCL2L11*, *DAPK1* [11, 12] при РМЖ и показана их значимость для диагностики РМЖ.

Цель работы – определение роли aberrантного метилирования группы генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* в прогрессии РМЖ и роли ко-метилирования и ко-экспрессии в совместной регуляции и функциях.

Методика

Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы РМЖ собраны и клинически и морфологически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на основании классификации ВОЗ [13]. В работе использованы 50 образцов РМЖ (табл. 1).

В исследовании использовали образцы РМЖ, полученные от больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [14]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3-5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. Образцы тканей хранили при -70°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора Tissue Ruptor II (QIAGEN, Германия).

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. ДНК хранили при -20°C . Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 («Thermo Scientific», США). Концентрация составила от 250 до 550 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2,10-2,35$; $A_{260}/A_{230} = 2,15-2,40$. Целостность ДНК оценивали с использованием электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда с известной концентрацией.

Уровень метилирования ДНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ), как описано в работах [11, 12]. Амплификацию проводили на системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом с использованием набора qPCRmix-HS SYBR по протоколу компании «Евроген» (Россия). Все олигонуклеотиды подобраны по программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* приведены в таблице 2. Для контрольного локуса АСТВ1 использованы олигонуклеотиды из работы [15]. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК (№ G1471; «Promega», США). В качестве положительного контроля 100% метилирования использовали коммерческий препарат ДНК (#SD1131; «Thermo Fisher Scientific»).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических про-

Таблица 1/Table 1

Клинико-патоморфологические параметры 50 использованных образцов РМЖ

Clinical and pathomorphological parameters of 50 breast cancer samples used

Параметр	Количество	
Стадия опухолевого процесса	Ранние стадии (I + II)	44
	III стадия	6
Размер первичной опухоли	T1	14
	T2	29
	T3	3
	T4	4
Лимфогенное метастазирование	Есть	21
	Нет	29

грамм IBM SPSS Statistics 22 и в программной среде R. Значимость различий между исследуемыми группами оценивали с использованием непараметрического U-теста Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Корреляционный анализ проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена с поправкой на множественные сравнения Беньямини–Хохберга.

Данные об экспрессии и метилировании исследуемых генов при РМЖ взяты также из баз данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>) и GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), о процессах

и сигнальных путях – из базы ncPath (<http://ncpath.pianlab.cn/#/Home>).

Результаты и обсуждение

Гиперметилирование 6 генов апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* и связь с прогрессией РМЖ. С применением биоинформатического анализа базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.genome.jp/kegg/>) нами отображены 6 ключевых генов митохондриального пути апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*. Методом МС-ПЦР показано ($p < 0,05$) значимое увеличение уровня метилирования для 5 генов *APAF1*, *BAK1*,

Таблица 2/Table 2

Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры количественной МС-ПЦР

Primer nucleotide sequences and qMS-PCR parameters

Ген днРНК	Последовательности олигонуклеотидов ^a , 5'→3'	$T_{отж}$, °C	Размер ампликона, п.н.
<i>APAF1</i>	MF: TTTTGAGGTTTAGTTACGTTTCGTTCCGC	60	222
	MR: CGTCCACTCGCTACCTCTTCTCTC		
	UF: AGTTTGGTATTGGTGGGAATGTGGTG	60	259
	UR: AACAAATCACATCCACTCACTACCTCTTCTT		
<i>BAK1</i>	MF: GTCGGTTTGTGCGTTTGTATTC	60	233
	MR: AAATCCCGAAAACTAACGACTACTACTCC		
	UF: TTATTTTATAGGTTGTGGTTTGTGT	60	181
	UR: AACATCAATACATTCCCAACAT		
<i>BAX</i>	MF: GATGTTTATTGGATAGTTACGTGACGGGA	60	115
	MR: ACGTAACCGCCCCGAAAATA		
	UF: GTTGATGGTGTTATTGTTGGTATTATTG	58	183
	UR: AATCACATAAAAACCCCACTAACATACA		
<i>BCL2</i>	MF: GAAGTCGTCGTCGGTTTG	60	182
	MR: CCCGACCCGAACATCG		
	UF: TTGTTGTTGGTTTGGTGGA	60	163
	UR: CCCACACCAAACATCTTCTC		
<i>BIM</i>	MF: TTCGGTAAATAATGGGGTCGGAGTAG	60	134
	MR: CGAATAAATCAAAAACCTCCCAACGACTCTA		
	UF: AATAATGGGGTTGGAGTAGGGAATGTG	60	128
	UR: TCAAATAAATCAAAAACCTCCCAACACTCT		
<i>DAPK1</i>	MF: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	62	98
	MR: CCCTCCCAAACGCCGA		
	UF: GGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	62	106
	UR: CAAATCCCTCCCAAACACCAA		

Примечание. MF/UF – прямые праймеры к метилированному/неметилированному аллелю, MR/UR – обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю.

Note. MF/UF – forward primers to methylated/unmethylated allele, MR/UR – reverse primers to methylated/unmethylated allele.

BAX, *BIM*, *DAPK1* в опухоли по сравнению с нормальной тканью молочной железы (рис. 1). Гиперметилирование гена *BCL2* установлено нами ранее [11].

Полученные экспериментально результаты по гиперметилированию генов были сопоставлены с данными из базы данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>), которая содержит в себе информацию о 724 метилированных генах-биомаркерах из опубликованных статей в PubMed, а также данных полногеномного секвенирования метилирования ДНК (WGBS). Данные по гиперметилированию/деметилированию гена *BAX* и *BCL2* в базе MethMarkerDB не представлены. На рисунке 2 приведены данные об aberrантном метилировании 4 генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *BIM*, *DAPK1* в образцах РМЖ ($p < 0,01$). Таким образом, полученные нами результаты о гиперметилировании 4 генов системы апоптоза экспериментально согласуются с данными биоинформатического анализа базы MethMarkerDB.

Проведен анализ изменений уровня метилирования 6 генов апоптоза (*APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*) в зависимости от клинко-патоморфологических показателей прогрессии РМЖ. Показано значи-

мое ($p < 0,05$) увеличение уровня метилирования на более поздней стадии (III) по сравнению с более ранними стадиями (I-II) РМЖ (рис. 3, А), и с увеличением размера опухоли (T_3 - T_4) по сравнению с размером опухоли T_1 - T_2 (рис. 3, Б) для генов *APAF1*, *BAK1*, *DAPK1*. Увеличение уровня метилирования генов *APAF1* и *BIM* отмечено ($p < 0,05$) при наличии метастазов в лимфатических узлах: N_0 против N_1 - N_3 (рис. 3, В).

Таким образом, выявлена связь метилирования генов с более поздней стадией РМЖ, с размером опухоли и наличием лимфогенного метастазирования, что может быть использовано для прогноза течения заболевания.

Ко-метилирование как маркер совместной регуляции группы генов апоптоза и совместного участия в процессах. Апоптоз представляет сложный комплексный процесс, включающий множество этапов и процессов, протекающих параллельно; апоптоз основан на активации отдельных сигнальных путей, регуляция которых нарушена в злокачественных опухолях [16]. Изучение одного или нескольких апоптотических компонентов, экспрессия которых изменяется и влияет на канцерогенез, может помочь отсле-

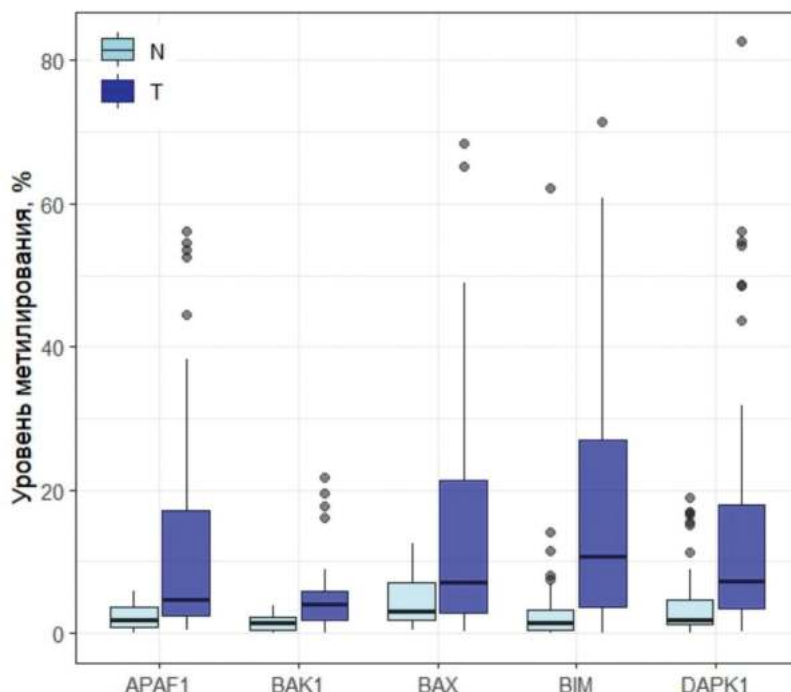


Рис. 1. Уровень метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1* в 50 парных образцах опухолей молочной железы и парных к ним нормальных тканях.

Fig. 1. Methylation level of the *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1* genes in 50 paired samples of breast tumors and paired normal tissues.

живать прогрессирование заболевания. Множество работ сообщают об использовании различных апоптотических компонентов в качестве маркеров прогноза и прогнозирования при различных типах рака человека [16]. Детальное исследование роли генов системы апоптоза, их регуляции и функции остаётся значимой задачей, тем более что показано диагностическое и прогностическое значение уровней

экспрессии и метилирования для ряда ключевых генов системы апоптоза, таких как *APAF1*, *BAX*, *BIM*/*BCL2L11*, *DAPK1* [12].

Сети совместной экспрессии генов используют для связывания генов с неизвестной функцией с биологическими процессами [17]. Нами поставлена задача выявления возможного ко-метилирования для группы генов системы апоптоза, что важно для понимания

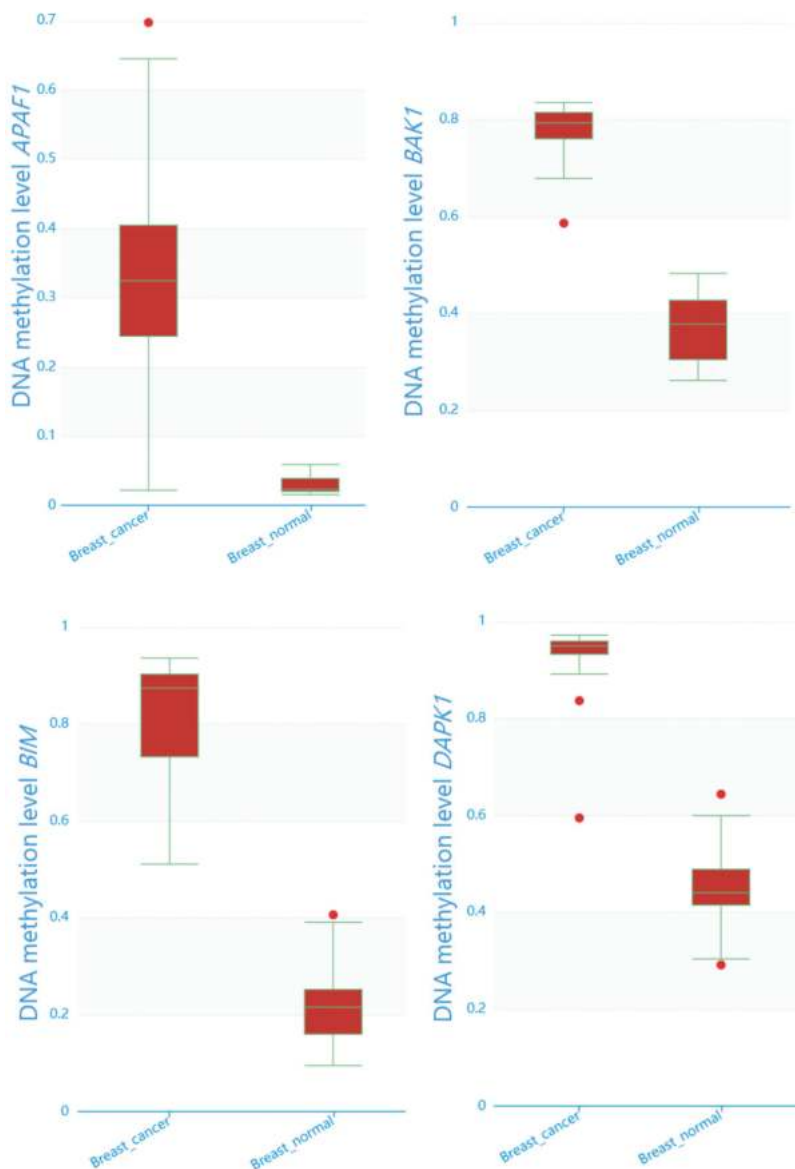


Рис. 2. Уровень метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *BIM*, *DAPK1* в образцах опухолей молочной железы и нормальных тканях молочной железы по данным из базы данных MethMarkerDB.

Fig. 2. Methylation level of *APAF1*, *BAK1*, *BIM*, *DAPK1* genes in breast tumor samples and normal breast tissues according to data from the MethMarkerDB database.

их регуляции и функционирования в процессах и сигнальных путях в системе апоптоза.

Методом статистического анализа с применением коэффициента корреляции Спирмена с поправкой на множественные сравнения Беньямини–Хохберга установили умеренные и высокие статистически значимые положительные корреляции относительного уровня метилирования для 4 пар белоккодирующих генов: *BCL2 – BIM*, *APAF1 – DAPK1*, *APAF1 – BIM*, *APAF1 – BCL2* ($r_s\{0,30-0,46\}$; $p<0,05$) (табл. 3).

На рисунке 4 приведена корреляционная матрица, наглядно отражающая ко-метилование 6 белок-кодирующих генов системы апоптоза при РМЖ.

Как видно из рис. 4, наиболее значимое ко-метилование проявили пары: *APAF1 – BCL2*, *APAF1 – BIM*, *BCL2 – BIM* ($r_s>0,3$, $p<0,01$), и несколько слабее ($r_s>0,2$, $p<0,05$): *APAF1 – DAPK1* и *BAX – DAPK1*.

Полученные данные о ко-метиловании этой группы генов позволяют предположить их согласо-

ванную регуляцию. Для подтверждения согласованной регуляции требовалось проверить наличие корреляций между уровнями экспрессии. Для этого мы провели анализ базы данных GEPIA 2.0, в которой содержатся данные об экспрессии генов из библиотек TCGA для 1085 образцов РМЖ и 112 образцов нормальной ткани (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). По результатам анализа выявили умеренные и высокие положительные корреляции экспрессии в следующих парах: *APAF1 – BCL2*, *APAF1 – BIM*, *APAF1 – DAPK1*, *BCL2 – BIM*. Коэффициент корреляции Спирмена и p-value для ко-экспрессирующихся пар приведены на рисунке 5. Таким образом, для 4 пар генов из 5, данные по ко-метилованию, полученные нами экспериментально, согласуются с данными по ко-экспрессии, полученные путем биоинформатического анализа базы GEPIA2.0.

Ко-метилование и ко-экспрессия, показанные для 4 пар генов, означают их совместную регуляцию

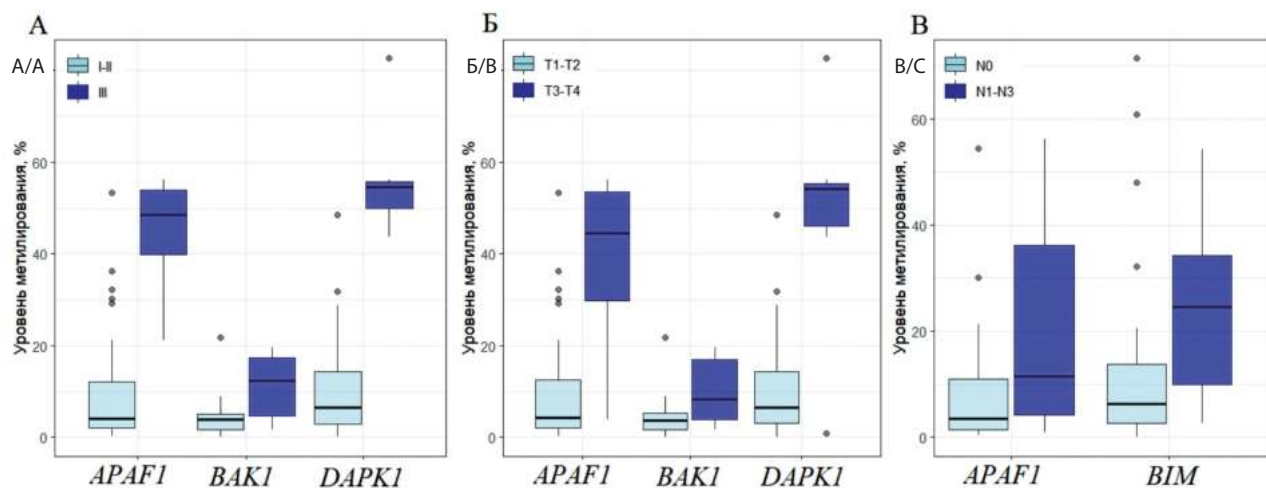


Рис. 3. Уровень метилирования генов А) в образцах опухолей молочной железы на поздней стадии РМЖ (III) по сравнению с ранними стадиями РМЖ (I-II); Б) в образцах опухолей молочной железы с размером опухоли T₃-T₄ по сравнению с T₁-T₂; В) в образцах опухолей молочной железы с метастазами (N₁-N₃) и без метастазов (N₀).

Fig. 3. Level of gene methylation A) in breast tumor samples at late stages of breast cancer (III) compared with early stages of breast cancer (I-II); B) in breast tumor samples with tumor size T₃-T₄ compared to T₁-T₂; B) in samples of breast tumors with metastases (N₁-N₃) and without metastases (N₀).

Таблица 3/ Table 3

Значения коэффициента корреляции Спирмена и уровня статистической значимости (p) для ко-метилованных генов
Spearman correlation coefficient and statistical significance level (p) values for co-methylated genes

БКГ	BCL2	APAF1	APAF1	APAF1
	BIM	DAPK1	BIM	BCL2
r_s	0.35	0.3	0.38	0.46
p	0.01	0.04	<0.01	<0.01

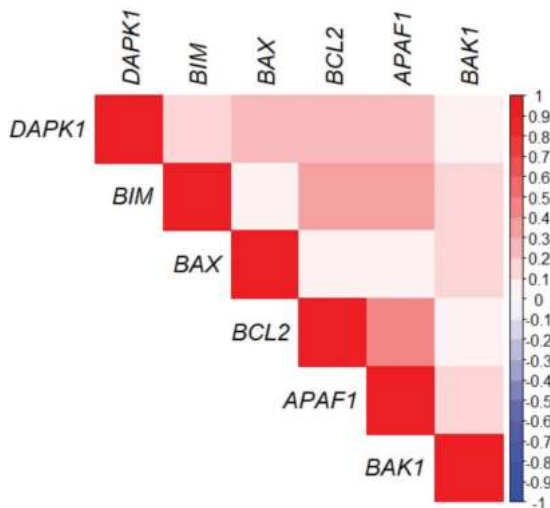


Рис. 4. Корреляционная матрица степени корреляции между уровнями метилирования 6 генов *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*. Красным цветом показаны положительные корреляции; интенсивность цвета эквивалентна коэффициенту корреляции Спирмена.

Fig. 4. Corplot of the degree of correlation between the methylation levels of 6 genes *APAF1*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*. Positive correlations are shown in red; color intensity is equivalent to Spearman's correlation coefficient.

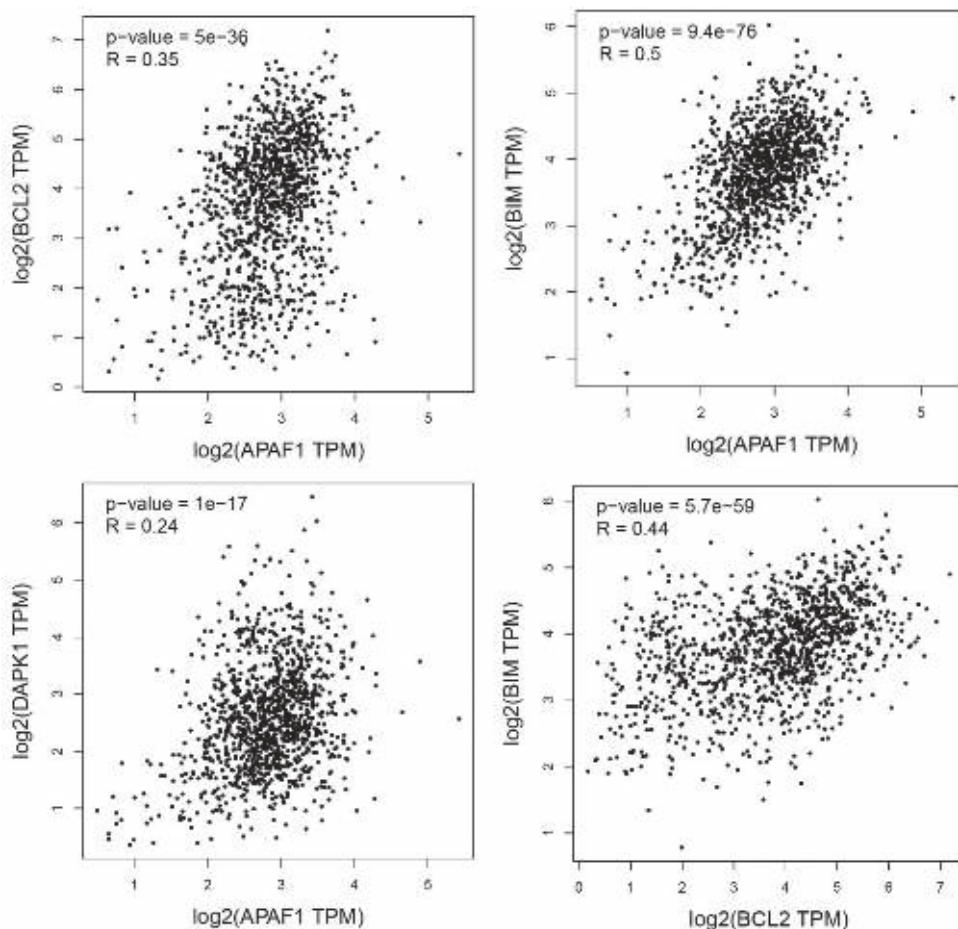


Рис. 5. Корреляция относительных уровней экспрессии генов *APAF1*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* по данным TCGA (1085 образцов РМЖ и 112 нормы) (построено в GEPIA 2.0, <http://gepia.cancer-pku.cn/>, accessed on 20 April 2024).

Fig. 5. Correlation of relative gene expression levels of *APAF1*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* according to TCGA data (1085 breast cancer samples and 112 normal samples) (built in GEPIA 2.0, <http://gepia.cancer-pku.cn/>, accessed on April 20, 2024).

в опухолях молочной железы. Сети совместной экспрессии генов широко используют для связывания генов с неизвестной функцией с их совместным участием в общих биологических процессах [17]. С привлечением базы данных ncPath (<http://ncpath.pianlab.cn/№/Home>) мы провели анализ обогащения по функциональной принадлежности и установили, что белоккодирующие гены *APAF1*, *BAK1*, *VAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* участвуют также, помимо известных процессов апоптоза (hsa04210) и p53-сигнального пути (hsa04115), в таких сигнальных путях как устойчивость к ингибиторам тирозинкиназы EGFR (hsa01521), некроптоз (hsa04217), нарушение регуляции транскрипции при раке (hsa05202), аутофагия (hsa04140), РМЖ (hsa05224) и др. Таким образом, предположение об участии исследуемых белоккодирующих генов в общих сигнальных путях и биологических процессах получило подтверждение при анализе базы данных ncPath. И нами также показано, что ко-метилирование может служить признаком совместного участия группы генов в общих биологических процессах.

Стоит указать, что данные о ко-метилировании генов системы апоптоза *APAF1*, *BAK1*, *VAX*, *BCL2*, *VIM*, *DAPK1* ранее не сообщались (PubMed 2023/05/06) и представленные данные имеют фундаментальное значение.

Гиперметилирование белоккодирующих генов *APAF1*, *BCL2* показано и при других видах рака, например, при раке прямой кишки и поджелудочной железы [1, 10]. В работе [19] авторами отмечается, что метилирование промотора гена *DAPK1* может приводить к инактивации гена и, как следствие, может быть связано с прогрессированием рака шейки матки.

Заключение

Таким образом, в данной работе показана ассоциация высокого уровня метилирования генов *APAF1*, *BAK1*, *DAPK1* с более поздними стадиями РМЖ, и размером опухоли T₃-T₄, а генов *APAF1* и *VIM* с наличием метастазов в лимфатические узлы. Впервые установлены положительные корреляции относительного уровня метилирования для генов *BCL2 – VIM*, *APAF1 – DAPK1*, *APAF1 – VIM*, *APAF1 – BCL2* ($r_s\{0,30-0,46\}$; $p<0,05$). Полученный результат согласуется с данными корреляционного анализа экспрессии базы данных GEPiA 2.0. Кроме того, анализ обогащения по функциональной принадлежности базы данных ncPath позволил установить ко-регуляцию и совместное участие в общих сигнальных путях для ряда генов системы апоптоза.

Изучение молекулярных механизмов развития и прогрессии РМЖ, а также новое представление

о паттернах метилирования генов системы апоптоза приблизит к открытию новых мишеней для таргетной терапии РМЖ. Гиперметилирование промоторных CpG-островков исследуемых генов вносит вклад в дерегуляцию их экспрессии и непосредственно влияет на функции этой группы генов, участвующих в различных каскадах сигнальных путей.

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

Литература

(п.п. 2-19 см. References)

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

References

1. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. *Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2021 godu (zabolevaemost' i smertnost')]. Moscow: MNI OI Herzen – branch of the «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of Russia; 2022. (in Russian)
2. Petri B.J., Klinge C.M. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39: 837–86. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09905-7>
3. Garcia-Martinez L., Zhang Y., Nakata Y., Chan H.L., Morey L. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nat. Commun.* 2021; 12: 1786. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22024-3>
4. Dhillon S. Decitabine/Cedazuridine: First Approval. *Drugs.* 2020; 80: 1373–8. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01389-7>
5. Pasculli B., Barbano R., Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol.* 2018; 51: 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.007>
6. Brown L.J., Achinger-Kawecka J., Portman N., Clark S., Stirzaker C., Lim E. Epigenetic therapies and biomarkers in breast cancer. *Cancers.* 2022; 14: 474. <https://doi.org/10.3390/cancers14030474>
7. Szczepanek J., Skorupa M., Jarkiewicz-Tretyn J., Cybulski C., Tretyn A. Harnessing Epigenetics for Breast Cancer Therapy: The Role of DNA Methylation, Histone Modifications, and MicroRNA. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 7235. <https://doi.org/10.3390/ijms24087235>
8. Zhang X., Zhang X., Sun B., Lu H., Wang D., Yuan X., Huang Z. Detection of aberrant promoter methylation of RNF180, DAPK1 and SFRP2 in plasma DNA of patients with gastric cancer. *Oncol Lett.* 2014; 8: 1745–50. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2410>
9. Tan Y.L., Chen H., Wu Z.K., He J., Jiang J.H. Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Absolute Methylation Quantification Revealed Hypermethylated DAPK1 in Cervical Cancer Patients. *Anal Chem.* 2021; 93: 8077–83. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01510>
10. Lukosiute-Urboniene A., Mazeika A., Kazokaite M., Silkuniene G., Silkunas M., Barauskas V., et al. Epigenetic regulation of APAF-1

- Through DNA methylation in pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2020; 40: 3765-79. doi: 10.21873/anticancerres.14366
11. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyi A.M., Pereyaslova E.A., Braga E.A., Kazubskaya T.P., et al. Role of methylation in the regulation of apoptosis genes APAF1, DAPK1, and BCL2 in breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 162: 797-800. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3716-z>
 12. Braga E.A., Burdennyi A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Fridman M.V., et al. System of markers based on the methylation of a group of proapoptotic genes in combination with MicroRNA in the diagnosis of breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2020; 168: 366-70. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04710-2>
 13. *TNM Classification of Malignant Tumours.* Eds. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Oxford, UK: John Wiley & Sons; 2017.
 14. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013; 310(20): 2191-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
 15. Hattermann K., Mehdorn H.M., Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal. Biochem.* 2008; 377(1): 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.014>
 16. Kashyap D., Garg V.K., Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021; 125: 73-120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>
 17. van Dam S., Vösa U., van der Graaf A., Franke L., de Magalhães J.P. Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions. *Brief Bioinform.* 2018; 19: 575-92. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw139>
 18. Benard A., Zeestraten E.C., Goossens-Beumer I.J., Putter H., van de Velde C.J., Hoon D.S., et al. DNA methylation of apoptosis genes in rectal cancer predicts patient survival and tumor recurrence. *Apoptosis.* 2014; 19(11): 1581-93. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1022-z>
 19. Banzai C., Nishino K., Quan J., Yoshihara K., Sekine M., Yahata T., et al. Gynecological Cancer Registry of Niigata. Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2014; 19(1): 127-32. <https://doi.org/10.1007/s10147-013-0530-0>

Сведения об авторах:

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

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

Бурдённий Алексей Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; науч. сотр., лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБУН ИБХФ РАН;

Пronina Ирина Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; и.о. зав. каф. физиологии, экологии человека и медико-биологических знаний ФГБОУ ГУП;

Логинов Виталий Игоревич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ МГНЦ;

Аржанухина Наталья Александровна, науч. сотр., лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

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

Брага Элеонора Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ МГНЦ.

Галимова Э.Ф.¹, Галимов К.Ш.², Громенко И.Д.¹, Галимов Ш.Н.¹, Усова С.Д.², Литвицкий П.Ф.²

Взаимосвязь фрагментации ДНК сперматозоидов и тератозооспермии при идиопатическом бесплодии

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

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет),

119991, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2

Бесплодие является растущей проблемой во всех странах мира, при этом примерно половина всех случаев приходится на долю мужчин. Эпидемиологические исследования показали существенное снижение качества эякулята за последние десятилетия в глобальном масштабе. В связи с этим бесплодные мужчины должны проходить детальное обследование, первым этапом которого является базовый анализ спермы. Тератозооспермия, определяемая как аномальная морфология сперматозоидов, часто сочетается с олигоастенозооспермией. Однако изолированная тератозооспермия представляет собой мало изученное состояние с непредсказуемыми последствиями с точки зрения потенциала фертильности мужчины и стратегии лечения. **Цель исследования:** оценить распространенность и взаимосвязь изолированной тератозооспермии с фрагментацией ДНК сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием.

Методика. В ретроспективном исследовании приняли участие мужчины в возрасте от 20 до 50 лет с установленным диагнозом идиопатического бесплодия. В группу фертильных доноров вошли 155 человек, в группу бесплодных мужчин – 264. Исследованы основные характеристики эякулята и выполнен морфологический анализ сперматозоидов с оценкой частоты дефектов головки, шейки, жгутика и избытка остаточной цитоплазмы.

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

Результаты. Изолированные аномалии спермограммы: олиго-, астено- и тератозооспермия выявлены у 44,7% пациентов с идиопатическим бесплодием. Сочетание двух и более отклонений от нормальных значений обнаружено у 42,8% бесплодных мужчин. У 12,5% пациентов показатели спермы соответствовали референтным значениям. Корреляционный анализ Спирмена и многофакторный анализ СС1 (индекс коморбидности Чарлсона) показал, что у мужчин с идиопатическим бесплодием показатель фрагментации ДНК сперматозоидов повышен и тесно коррелирует с наличием изолированной тератозооспермии с учетом возраста и других факторов риска ($p < 0,0365$ и $p < 0,02$, соответственно).

Заключение. Мужчины с идиопатическим бесплодием и изолированной тератозооспермией имеют более высокую частоту фрагментации ДНК сперматозоидов, чем пациенты с другими изолированными аномалиями или нормальными параметрами спермы. Полученные данные являются основанием для рекомендации по исследованию маркеров интенсивности окислительного стресса и качества ДНК сперматозоидов в повседневной клинической практике у этой категории больных.

Ключевые слова: идиопатическое мужское бесплодие; изолированная тератозооспермия; фрагментация ДНК

Для цитирования: Галимова Э.Ф., Галимов К.Ш., Громенко И.Д., Галимов Ш.Н., Усова С.Д., Литвицкий П.Ф. Взаимосвязь фрагментации ДНК сперматозоидов и тератозооспермии при идиопатическом бесплодии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 15-22.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.15-22

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Галимова Э.Ф.; сбор данных, анализ и интерпретация данных – Громенко И.Д., Галимов К.Ш., Усова С.Д.; написание статьи – Галимова Э.Ф., Галимов Ш.Н.; редактирование статьи – Литвицкий П.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Галимова Эльмира Фанисовна, e-mail: efgalimova@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Galimova E.F.¹, Galimov K.Sh.², Gromenko I.D.¹, Galimov Sh.N.¹, Usova S.D.², Litvitskiy P.F.²**The relationship of sperm DNA fragmentation and teratozoospermia in idiopathic infertility**¹Bashkir State Medical University,
3 Lenina St., Ufa, 450008, Russian Federation;²Sechenov First Moscow State Medical University,
8 Trubetskaya St., Bldg. 2, Moscow, 119991, Russian Federation

Infertility is a growing problem worldwide, with the male factor accounting for approximately half of all cases. Epidemiological studies have shown a significant decline in semen quality worldwide during recent decades. Thus, infertile men should undergo a detailed examination, the first step of which is a basic semen analysis. Teratozoospermia, defined as abnormal sperm morphology, is often associated with oligoasthenozoospermia. However, isolated teratozoospermia is an understudied clinical condition with unpredictable consequences in terms of the male fertility potential and the treatment strategy. **Aim of the study:** to evaluate the prevalence of isolated teratozoospermia and its relationship with sperm DNA fragmentation in a cohort of men with idiopathic infertility.

Methods. This retrospective study included men aged 20 to 50 years diagnosed with idiopathic infertility. The group of fertile donors consisted of 155 people, and the group of infertile men consisted of 264 people. Major characteristics of the ejaculate were studied and a morphological analysis of sperm was performed with assessment of the frequency of defects of the head, neck, flagellum, and excess residual cytoplasm. DNA fragmentation was assessed using the TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling Assay) method. To calculate the proportion of cells with damaged DNA, flow cytometry was performed on a Beckman Coulter Navios Flow Cytometer apparatus. Teratozoospermia index (TZI) was estimated with a bright light microscope (CX 31 Olympus Optical Co., Ltd., Japan).

Results. Isolated types of spermogram abnormalities, including oligo-, astheno- and teratozoospermia, were detected in 44.7% of patients with idiopathic infertility. A combination of two or more abnormal values was found in 42.8% of infertile men; in 12.5% of patients, the sperm parameters consisted with the reference values. Spearman correlation analysis and multivariate analysis of the CCI (Charlson Comorbidity Index) showed that in men with idiopathic infertility, the sperm DNA fragmentation rate was increased and was closely associated with isolated teratozoospermia taking into account the age and other risk factors ($p < 0.0365$ and $p < 0.02$, respectively).

Conclusion. Men with idiopathic infertility and isolated teratozoospermia have a higher frequency of sperm DNA fragmentation than patients with other isolated abnormalities or normal sperm parameters. These results can form the basis for a recommendation to study markers of oxidative stress intensity and sperm DNA quality in this category of patients in routine clinical practice.

Keywords: idiopathic male infertility; isolated teratozoospermia; DNA fragmentation

For citation: Galimova E.F., Galimov K.Sh., Gromenko I.D., Galimov Sh.N., Usova S.D., Litvitskiy P.F. The relationship of sperm DNA fragmentation and teratozoospermia in idiopathic infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 15-22. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.15-22

Author's contribution: concept and design of the work – Galimova E.F.; data collection, analysis and interpretation of data – Gromenko I.D., Galimov K.Sh., Usova S.D.; writing the text – Galimova E.F., Galimov Sh.N.; editing the text – Litvitskiy P.F. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Elmira F. Galimova*, DSc, associate prof., Bashkir State Medical University, e-mail: efgalimova@mail.ru

Information about the authors:Galimova E.F., <https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>Galimov K.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0148-4380>Gromenko I.D., <https://orcid.org/0000-0001-8582-660X>Galimov Sh.N., <https://orcid.org/0000-0002-5871-5151>Usova S.D., <https://orcid.org/0009-0004-6176-7755>Litvitskiy P.F., <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 13.06.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Распространенность бесплодия растет во всех странах мира и в настоящее время затрагивает около 15-20% всех супружеских пар [1, 2]. Программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) помогли забеременеть миллионам женщин, однако имеющиеся технологии еще не всегда эффективны. Только треть процедур ЭКО и интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI – ИКСИ) приводит к живорождению [3, 4]. Рецидивирующие неудачи ВРТ в первую очередь вызваны идиопатическим бесплодием мужчин. Частота его, по данным различных авторов, составляет от 15 до 60% всех случаев этой патологии и нередко сочетается с нормальными данными спермограммы [5, 6]. В связи с этим, рутинные показатели качества эякулята не могут достоверно прогнозировать вероятность естественного зачатия или предсказать результаты ВРТ.

К числу важных маркеров бесплодия относится тератозооспермия (TZS), которая представляет собой гетерогенную группу нарушений структуры, включающую широкий спектр аномальных фенотипов сперматозоидов [7, 8]. TZS является результатом дефектной дифференцировки клеток во время сперматогенеза и связана с генетическими факторами, состоянием окружающей среды, возрастом отца, окислительным и психологическим стрессом [9, 10]. В последние годы показатель заболеваемости тератозооспермией растёт и стал весьма важным фактором риска инфертильности.

Изолированная TZS (iTZS), как единственный измененный параметр, выявляемый при стандартном анализе спермы, является нередкой находкой у бесплодных мужчин [11]. В работах последних лет активно обсуждаются вопросы взаимосвязи iTZS с различными клиническими данными, маркерами воспаления и молекулярно-генетическими характеристиками эякулята, в том числе, с фрагментацией ДНК сперматозоидов (Sperm DNA Fragmentation – SDF) [12, 13]. В целом, iTZS и SDF ассоциированы со снижением частоты оплодотворения, качества эмбрионов и вероятности наступления беременности, а также с более высокой частотой самопроизвольных выкидышей. Учитывая эти контрольные точки фертильности, выявление изолированной тератозооспермии, частоты фрагментации ДНК сперматозоидов, а также их сочетания, могут быть более значимыми диагностическими критериями мужского бесплодия, чем данные рутинных характеристик эякулята. Вместе с тем, патогенез этих нарушений и взаимосвязь между ними изучены

недостаточно. В имеющихся публикациях преобладает мнение о том, что бесплодные мужчины с iTZS имеют более высокие показатели фрагментации ДНК сперматозоидов и несбалансированный статус окислительного стресса, чем фертильные мужчины. В то же время, частота изменений ДНК у пациентов с iTZS по сравнению с мужчинами с другими изолированными аномалиями спермы, ранее специально не исследовалась. **Цель исследования** – оценить распространенность и взаимосвязь изолированной тератозооспермии с фрагментацией ДНК сперматозоидов в когорте мужчин с идиопатическим бесплодием.

Методика

Работа выполнена на базе клиники ВРТ «Семья» г. Уфы. В исследование включено 419 мужчин репродуктивного возраста от 20 до 50 лет (средний возраст $31,3 \pm 0,4$).

Пациенты были разделены на подгруппы с изолированными аномалиями спермы в соответствии с референтными значениями ВОЗ: изолированная олигозооспермия (iOZS: <15 млн сперматозоидов на 1 мл и <39 млн сперматозоидов в эякуляте, прогрессивная подвижность $\geq 32\%$ и $\geq 4\%$ нормальных форм); изолированная астенозооспермия (iAZS: <32% прогрессивная подвижность, ≥ 15 миллионов сперматозоидов/мл и $\geq 4\%$ нормальных форм); изолированная тератозооспермия (iTZS: <4% нормальных форм, ≥ 15 млн сперматозоидов/мл и $\geq 32\%$ прогрессивная подвижность). При статистическом анализе рассматривались группы из 264 бесплодных и 155 фертильных мужчин контрольной группы.

Анализ семиологических образцов выполняли согласно «Руководству ВОЗ по лабораторному исследованию и оценке человеческой спермы» (2010). Процентное содержание морфологически нормальных и аномальных сперматозоидов оценивали путем анализа не менее 200 клеток в каждом образце. В качестве дополнительного критерия качества эякулята рассчитывали индекс тератозооспермии, который показывает среднее количество дефектов на один аномальный сперматозоид, и находится в диапазоне от 1 до 4. Это означает, что один сперматозоид может содержать один дефект или комбинацию двух, трех или всех четырех дефектов одновременно. Морфологию сперматозоидов и индекс тератозооспермии (TZI) оценивали с помощью микроскопа с ярким освещением (CX 31 Olympus Optical Co., Ltd.). Оценка фрагментации ДНК осуществлялась методом TUNEL (The terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling assay) с применени-

ем набора Invitrogen Apo-Direct™ Kit. Для подсчета числа клеток с поврежденной ДНК использована проточная цитометрия на аппарате «Beckman Coulter Navios Flow Cytometer».

Все пациенты были осмотрены урологами-андрологами и подписали форму информированного согласия. Сбор данных осуществлялся с соблюдением принципов Хельсинкской декларации. Процедуры клинического исследования были одобрены локальным этическим комитетом.

Критериями включения были: отсутствие беременности в браке (более 12 мес половой жизни без контрацепции); отсутствие клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса в половых железах; отсутствие аутоиммунных реакций против сперматозоидов; концентрация сперматозоидов не менее 10 млн/мл; отсутствие нарушений эякуляции; отсутствие соматических заболеваний. Критериями исключения служили: обтурационная или иммунологическая форма бесплодия; наличие бесплодия у партнерши; алкогольная или наркотическая зависимость; рак яичек, а также участие в другом клиническом исследовании в последние 3 мес.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Pandas – Python Data Analysis Library, для визуализации результатов – Plotly Python Open Source. После проверки на нормальность распределения показателей с помощью теста Шапиро–Уилка, применен метод ранговой корреляции Спирмана по выявлению взаимозависимых величин. Определение силы корреляционных связей проводилось с помощью шкалы Чеддока. Для интерпретации силы связи между параметрами исследования применялись следующие уровни корреляции: <0,2 – отсутствие линейной зависимости, 0,2-0,4 – слабая зависимость, 0,4-0,7 – умеренная зависимость, 0,7-0,9 – сильная зависимость и > 0,9 – очень сильная зависимость.

Результаты

Полученные данные представлены в **таблице 1**.

Различные изолированные типы аномалии спермограммы – iTZS, iOZS, iAZS были выявлены у 44 (16,7%), 26 (9,8%) и 48 (18,2%) пациентов с идиопатическим бесплодием, соответственно. Сочетание двух разных отклонений от нормальных значений обнаружены у 66 (25,0%) бесплодных мужчин, олигоастенотератоспермия у 47 (17,8%). У 33 (12,5%) пациентов показатели спермы были нормальными. В целом, можно констатировать, что наиболее частой аномалией спермограммы в этой группе пациентов было сочетание двух или более патологических признаков. Изолированная ТЗС также была частой находкой, занимая второе место после изолированной АЗС.

Из 155 фертильных мужчин группы сравнения у 12 (7,7%) обнаружена iTZS, у 5 (3,2%) и 4 (2,6%) – iOZS и iAZS, соответственно. У 31 (19,9%) мужчины были найдены два или более признака аномалии спермы; 103 (66,5%) фертильных мужчин имели нормальные параметры спермы. У фертильных мужчин медианная концентрация сперматозоидов, прогрессивная подвижность и нормальная морфология составляли 48 (22,1-66,3) × 10⁶/мл, 47 (33-55)% и 2 (1-11)%, соответственно.

Изолированные аномалии чаще встречались у бесплодных, чем у фертильных мужчин (44,7% против 13,5%), так же, как и сочетанные формы – 42,8% против 20%. Обращает на себя внимание большая доля фертильных доноров с патологическими признаками эякулята – 33,5%, т.е. 1/3 из них имела ту или иную аномалию спермограммы. Эти данные не противоречат результатам других авторов, более того, L. Candela и соавт. [8] сообщили, что отклонения от нормы обнаруживаются у 60% фертильных мужчин.

Таблица 1/Table 1

Показатели эякулята обследованных мужчин в зависимости от статуса фертильности (абсолютное количество (процент аномалий))
Indicators of ejaculate of examined men depending on fertility status (absolute quantity (percentage of anomalies))

Показатель	Фертильные доноры (n=155)	Бесплодные мужчины (n=264)
Нормальные параметры спермы	103 (66,5)	33 (12,5)
Изолированная ТЗС (iTZS)	12 (7,7)	44 (16,7)
Изолированная ОЗС (iOZS)	5 (3,2)	26 (9,8)
Изолированная АЗС (iAZS)	4 (2,6)	48 (18,2)
Два отклонения от нормы	24 (15,5)	66 (25,0)
Олигоастенотератозооспермия	7 (4,5)	47 (17,8)

Сведения об индексе фрагментации ДНК сперматозоидов (SDF) и других параметрах эякулята у бесплодных участников исследования представлены в **табл. 2**.

Корреляционный анализ Спирмена показал, что у бесплодных мужчин SDF положительно связан с возрастом пациентов и отрицательно – с морфологией сперматозоидов (**см. рис. А, В**).

При многофакторном анализе ССИ (индекс коморбидности Чарлсона) обнаружено, что iTZS была связана с SDF ($p \leq 0,02$) после учета возраста, индекса массы тела и количества сперматозоидов (**табл. 3**).

Обсуждение

В группе пациентов, обратившихся за медицинской помощью по поводу идиопатического бесплодия, мы наблюдали распространенность изолированной тератозооспермии у 16,7% мужчин, в то время как изолированные варианты олиго- и астенозооспермии выявлены у 9,8% и 18,2% мужчин, соответственно. Эти результаты подтверждают данные других авторов, показавших, что у значительной доли бесплодных мужчин обнаруживаются изолированные аномалии сперматозоидов, причем наиболее распространенной из них является iAZS [14, 15].

В группе фертильных мужчин соответствующего возраста частота iTZS, iAZS и iOZS составила 7,7%, 2,6% и 3,2%, соответственно. Таким образом, эти данные показывают, что iTZS также является наиболее распространенной изолированной аномалией гамет и у фертильных мужчин. Необходимо отметить, что в первом и единственном исследовании, по доступным в литературе данным, в котором изучалась частота изолированных аномалий у мужчин с сохраненной фертильностью, были получены парадоксальные сведения о более высоком распространении изолированной тератозооспермии у них, чем у бесплодных мужчин, с почти трехкратным преобладанием – 35,9% против 11,9% [8]. Очевидно, что необходимо проведение дальнейших исследований этого феномена на расширенных выборках здоровых мужчин с учетом их этнических, возрастных и иных особенностей.

Ряд исследований был посвящен анализу корреляций между особенностями морфологии сперматозоидов, целостностью их ДНК и балансом про- и антиоксидантных процессов при бесплодии [10, 16]. Отмечено, что ряд форм патологии, включая воспалительные и инфекционные заболевания, сопровождаются избыточной интенсификацией окислительного стресса,

Таблица 2/Table 2

Показатели эякулята обследованных мужчин

Indicators of ejaculate of examined men

Показатель	Нормальные параметры спермы, n=33	iTZS n=44	iOZS n=26	iAZS n=48
Объем эякулята, мл Медиана 25-75%	3,1 2,0-4,1	3,1 2,0-4,1	3,6 3,0-4,2	3,1 2,0-4,4
Концентрация сперматозоидов, млн/мл Медиана 25-75%	40,6 22,3-76,4	49,4 28,7-85,4	6,0 2,6-11,5	36,2 24,7-62,8
Прогрессивно подвижные, доля Медиана 25-75%	44,1 37,5-52,0	45,2 35,0-51,7	41,8 33,2-54,3	14,4 10,2-26,0)
Нормальная морфология, доля Медиана 25-75%	12,9 9,1-35,0	1,0 0,0-2,1	15,9 5,3-37,5	11,4 6,8-23,5
SDF индекс, % Медиана 25-75%	14,1 5,0-22,7	26,8 12,8-44,2*;*†	12,2 6,6-31,4	13,9 8,5-35,0
SDF индекс ≥ 30 (n, %)	6 18,2	23 52,3	7 26,9	13 27,1

Примечание. * – $p < 0,001$ по сравнению с группой параметров нормальной спермы.

– $p < 0,001$ по сравнению с группой iOZS; † – $p < 0,001$ по сравнению с группой iAZS.

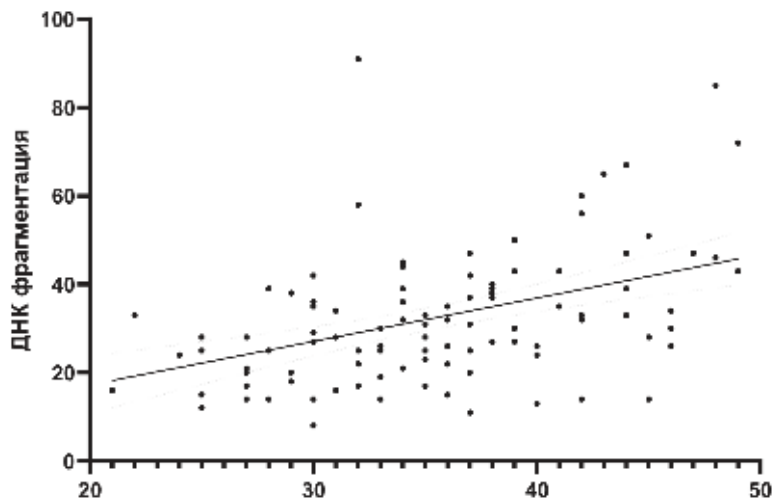
Note. * – $p < 0.001$ compared to the group of normal sperm parameters.

– $p < 0.001$ compared with the iOZS group; † – $p < 0.001$ compared with iAZS group.

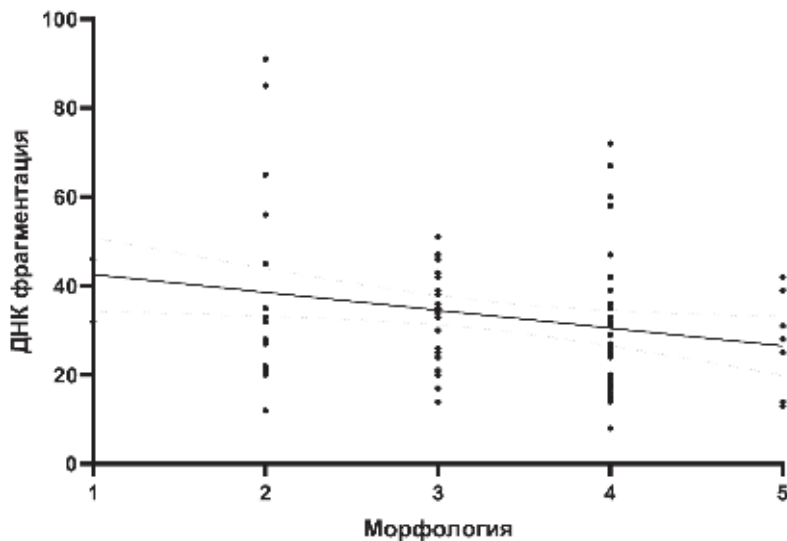
приводящей к нарушению структуры сперматозоидов. При этом обнаружено, что гиперпродукция АФК тесно связана с мужским бесплодием через повреждение ДНК и биомембран сперматозоидов [17].

В настоящее время имеется сравнительно мало данных о связи между изолированными аномалиями спермы и повреждением ДНК сперматозоидов. Показатель целостности ДНК гамет является относитель-

но недавним маркером качества эякулята, связанным с частотой как спонтанной, так и медикаментозной бесплодности в клинической практике. Предыдущие исследования показали, что у бесплодных мужчин повреждения структуры ДНК сперматозоидов выявляются чаще, чем у фертильных и что их частота и выраженность увеличивается вместе с количеством аномалий сперматозоидов [13, 18, 19]. Так, в работе J. Lu и соавт. [20] показано,



A – Rho=0,4438; p value <0,0001



B Rho=-0,1902; p value <0,0365

Корреляция между частотой фрагментацией ДНК (%) сперматозоидов (SDF), возрастом пациентов (годы, A) и нормальной морфологией сперматозоидов (проценты, B) у бесплодных мужчин. Rho и значение p согласно корреляции Спирмена.

Correlation between sperm DNA fragmentation frequency (%) (SDF), patient age (years, A) and normal sperm morphology (percentage, B) in infertile men. Rho and p value according to Spearman correlation.

что показатель SDF отрицательно связан с концентрацией сперматозоидов, их подвижностью, общим количеством нормальных и прогрессивно подвижных сперматозоидов и уровнем нормальной морфологии. Наши результаты подтверждают эти данные: чем больше аномалий спермы, тем выше показатель SDF у бесплодных мужчин. S. Brahem и соавт. [21] сообщили о повышенной фрагментации ДНК и более высоком уровне анеуплоидии сперматозоидов у бесплодных мужчин с iTZS по сравнению с фертильными. Важно отметить, что фрагментация ДНК коррелировала с частотой аномалий головки и хвоста сперматозоида, как это было продемонстрировано в нашей работе.

Несмотря на то, что причины повреждения ДНК сперматозоидов у бесплодных мужчин изучены недостаточно, в качестве этиологических факторов рассматриваются неправильная упаковка и нарушения конденсации хроматина в процессе созревания сперматозоидов, постмейозный дефектный апоптоз и окислительный стресс [12]. Эти факторы могут независимо или совместно быть ответственными за повреждение ДНК сперматозоидов у бесплодных мужчин с iTZS. Показано, что высокие уровни АФК в семенной жидкости со сниженной активностью антиоксидантных ферментов тесно коррелируют с увеличением уровня SDF и деконденсации хроматина сперматозоидов у мужчин с iTZS [11]. В целом, частота дефектов ДНК сперматозоидов и их апоптоза, а также интенсивность окислительного стресса взаимосвязаны и могут составлять единый мо-

лекулярный патогенетический механизм развития тератозооспермии.

Заключение

Согласно нашей исходной гипотезе, мы обнаружили, что бесплодные мужчины с iTZS имеют более высокие значения фрагментации ДНК по сравнению с бесплодными мужчинами как с нормальными параметрами эякулята, так и с другими изолированными аномалиями гамет. Таким образом, принимая во внимание наличие сильной связи между показателями iTZS, редокс-статуса и повышенными значениями SDF, можно предположить, что с клинической точки зрения обнаружение изолированной тератозооспермии у бесплодных мужчин не следует игнорировать, а напротив – рассматривать как показание для детальной оценки состояния окислительно-восстановительного баланса и степени повреждения ДНК сперматозоидов. В частности, мужчинам с iTZS можно рекомендовать пройти SDF-тестирование и, при необходимости, лечение, способное снизить уровень повреждения ДНК гамет [22]. Вместе с тем, в настоящее время отсутствуют убедительные доказательства того, что умеренная тератозооспермия снижает шансы на естественную беременность или является противопоказанием для ЭКО/ИКСИ. Учитывая недостаточность имеющихся в настоящее время доказательств, необходимы дальнейшие исследования для разработки подробных рекомендаций по оценке и лечению изолированной тератозооспермии.

Таблица 3/Table 3

Модели линейной регрессии, прогнозирующие SDF (бета; значение p [95% ДИ]) у бесплодных мужчин

Linear regression models predicting SDF (beta; p value [95% CI]) in infertile men

Показатель	Фрагментация ДНК спермы	
	Модель UVA	Модель MVA
Возраст	0,39; 0,17 [-0,15–0,96]	0,23; 0,75 [-0,43–0,78]
Индекс массы тела	0,24; 0,03 [0,07–0,65]	0,33; 0,02 [0,10–0,85]
iTZS	2,83; <0,001 [1,5–7,42]	2,23; 0,02 [0,82–6,47]
iOZS	-1,16; 0,36 [-3,19–6,73]	-1,21; 0,69 [-2,18–6,06]
iAZS	1,34; 0,45 [-7,3–6,17]	1,16; 0,91 [-2,27–4,50]
Количество сперматозоидов	-0,13; <0,002 [-0,14–0,05]	0,03; 0,59 [-0,07–0,09]

Примечание. UVA – одномерная модель; MVA – многомерная модель; ИМТ – индекс массы тела; iTZS – изолированная тератозооспермия; iOZS – изолированная олигозооспермия; iAZS – изолированная астенозооспермия.

Note. UVA – one-dimensional model; MVA – multidimensional model; BMI – body mass index; iTZS – isolated teratozoospermia; iOZS – isolated oligozoospermia; iAZS – isolated asthenozoospermia.

Литература

(п.п. 1-15; 17; 19-22 см. References)

16. Галимов Ш.Н., Ахметов Р.М., Галимова Э.Ф., Байрамгулов Ф.М., Биккулова Л.Р. Молекулярные аспекты влияния комплекса Сперотон на мужскую фертильность при идиопатическом бесплодии. *Урология*. 2017; 2: 88-92. <https://doi.org/10.18565/urol.2017.2.88-92>

18. Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Салимгареева М.Х., Громенко Р.И., Галимов Ш.Н., Громенко Д.Д. и др. Ассоциация фрагментации ДНК с кинетическими параметрами сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 22-8. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.22-28>

References

1. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C., Henkel R. Male infertility. *Lancet*. 2021; 397(10271): 319-33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)

2. Fallara G., Pozzi E., Belladelli F., Boeri L., Capogrosso P., Corona G., et al. A Systematic Review and Meta-analysis on the Impact of Infertility on Men's General Health. *Eur Urol Focus*. 2024; 10(1): 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2023.07.010>

3. De Geyter C., Wyna C., Calhaz-Jorge C., de Mouzon J., Ferraretti A., Kupka M., et al. 20 years of the European IVF-monitoring Consortium registry: what have we learned? A comparison with registries from two other regions. *Hum Reprod*. 2020; 35(12): 2832-49. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa250>

4. Sunderam S., Kissin D., Zhang Y., Jewett A., Boulet S., Warner L., et al. Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2018. *MMWR Surveill Summ*. 2022; 71(4): 1-19. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7104a1>

5. Bhattacharya I., Sharma S., Majumdar S. Etiology of Male Infertility: an Update. *Reprod Sci*. 2024; 31(4): 942-65. <https://doi.org/10.1007/s43032-023-01401-x>

6. Podgrajsek R., Hodzic A., Stimpfel M., Kunej T., Peterlin B. Insight into the complexity of male infertility: a multi-omics review. *Syst Biol Reprod Med*. 2024; 70(1): 73-90. <https://doi.org/10.1080/19396368.2024.2317804>

7. Patel P., Carrasquillo R., Madhusudanan V., Dadun S., Patel A., Smith N., et al. Impact of abnormal sperm morphology on live birth rates after intrauterine insemination. *J Urol*. 2019; 202(4): 801-5. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000288>

8. Candela L., Boeri L., Capogrosso P., Cazzaniga W., Pozzi E., Belladelli F., et al. Correlation among isolated teratozoospermia, sperm DNA fragmentation and markers of systemic inflammation in primary infertile men. *PLoS One*. 2021; 16(6): e0251608.

9. Chang Y., Jiang X., Liu W., Zhang D., Yang S., Zhao D. Molecular genetic mechanisms of teratozoospermia. *Zygote*. 2023; 31(2): 101-10. <https://doi.org/10.1017/S0967199422000594>

10. Ammar O., Mehdi M., Muratori M. Teratozoospermia: Its association with sperm DNA defects, apoptotic alterations, and oxidative stress. *Andrology*. 2020; 8: 1095-106.

11. Atmoko W., Savira M., Shah R., Chung E., Agarwal A. Isolated teratozoospermia: revisiting its relevance in male infertility: a narrative review. *Transl Androl Urol*. 2024; 13(2): 260-73. <https://doi.org/10.21037/tau-23-397>

12. Marinaro J., Schlegel P. Sperm DNA Damage and Its Relevance in Fertility Treatment: A Review of Recent Literature and Current Practice Guidelines. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(2): 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms24021446>

13. Farkouh A., Salvio G., Kuroda S., Saleh R., Vogiatzi P., Agarwal A. Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians. *Transl Androl Urol*. 2022; 11(7): 1023-44. <https://doi.org/10.21037/tau-22-149>

14. Belloc S., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie M., Dalleac A., Chahine H., Amar E., et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31(5): 527-32. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0194-3>

15. Fathi A., Castiglione F., Mohamed O. Varicocele versus antioxidants in infertile men with isolated teratozoospermia: A retrospective analysis. *Turk J Urol*. 2021; 47: 279-84. <https://doi.org/10.5152/tju.2021.21013>

16. Galimov Sh.N., Akhmetov R.M., Galimova E.F., Bairamgulov F.M., Bikkulova L.R. Molekular aspekts of the impact of the sperotom complex on the male fertility in idiopathic infertility. *Urologiya*. 2017; 2: 88-92. <https://doi.org/10.18565/urol.2017.2.88-92> (in Russian)

17. Barati E., Nikzad H., Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci*. 2020; 77(1): 93-113. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>

18. Gromenko I.D., Galimova E.F., Salimgareeva M.Kh., Gromenko R.I., Galimov Sh.N., Gromenko D.D., et al. Association of DNA fragmentation with kinetic parameters of spermatozoa in men with idiopathic infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2023; 67(4): 22-8. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.22-28> (in Russian)

19. Moskovtsev S., Willis J., White J., Mullen J. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology*. 2009; 74(4): 789-93. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.04.022>

20. Lu J., Jing J., Chen L., Ge Y., Feng R., Liang Y. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018; 16(1): 23. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0345-y>

21. Brahem S., Mehdi M., Elghezal H., Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(1): 41-8. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9482-8>

22. Salonia A., Bettocchi C., Carvalho J., Corona G., Jones T., Kadioglu A., et al. *EAU guidelines on sexual and reproductive health*. Arnhem, The Netherlands. 2020.

Сведения об авторах:

Галимова Эльмира Фанисовна, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии, доцент, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Галимов Камиль Шамильевич, ассистент каф. патологической физиологии, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Громенко Иван Дмитриевич, ассистент каф. биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Галимов Шамиль Нариманович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. биологической химии, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Усова Саломея Давидовна, студент, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского;

Литвицкий Пётр Францевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, каф. патологической физиологии, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092.18+577.115/616.69-008.6

Курашова Н.А., Дашиев Б.Г., Колесников С.И., Лабыгина А.В., Колесникова Л.И.

Окислительный стресс и показатели сперматогенеза у мужчин с идиопатическим бесплодием до и после приема этилметилгидроксипиридина малата

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»,
664003, Иркутск, Россия, ул. Тимирязева, д. 16

Окислительный стресс (ОС) в настоящее время признан важным фактором, способствующим развитию различных форм мужского бесплодия, включая идиопатическое. Современные исследования характеризуются высокой гетерогенностью, и убедительные выводы относительно влияния антиоксидантов (АО) на параметры эякулята пока не представлены. **Цель исследования** – оценка изменений основных параметров эякулята и состояния системы ПОЛ-АОЗ при применении у мужчин с идиопатическим бесплодием этилметилгидроксипиридин малата – препарата с антиоксидантными свойствами.

Методика. Ретроспективно проведен анализ результатов обследования мужчин ($n=225$) из бесплодных супружеских пар и выделены мужчины с идиопатическим бесплодием. Сформирована контрольная группа практически здоровых мужчин с реализованной репродуктивной функцией. Исследования эякулята проводили в соответствии с Руководством ВОЗ (2021). Определение показателей системы липопероксидации и антиоксидантной защиты проводили в эякуляте общепринятыми спектрофотометрическими и флуорометрическими методами.

Результаты. После приема препарата этилметилгидроксипиридин малата в течение 1 месяца в сперме бесплодных мужчин установлено повышение числа сперматозоидов с прогрессивной подвижностью в отличие от пациентов, не принимавших данный препарат. В эякуляте мужчин, не принимавших антиоксидантный препарат, не выявлено значимых изменений показателей системы ПОЛ-АОЗ. После приема антиоксидантного препарата в эякуляте мужчин с идиопатическим бесплодием отмечается статистически значимое снижение показателей ПОЛ на фоне повышения мощности антиоксидантной системы, выражающееся в достоверном повышении уровня СОД и АОА.

Заключение. Таким образом, в результате исследования установлено, что антиоксидантный препарат этилметилгидроксипиридин малат оказывает активирующее влияние на концентрацию и подвижность сперматозоидов, а также снижает окислительные процессы в эякуляте мужчин с идиопатическим бесплодием.

Ключевые слова: идиопатическое мужское бесплодие; окислительный стресс; антиоксиданты; этилметилгидроксипиридин малат; сперматозоиды

Для цитирования: Курашова Н.А., Дашиев Б.Г., Колесников С.И., Лабыгина А.В., Колесникова Л.И. Окислительный стресс и показатели сперматогенеза у мужчин с идиопатическим бесплодием до и после приема этилметилгидроксипиридина малата. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(3): 23-30.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.23-30

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Колесникова Л.И.; сбор и обработка материала – Курашова Н.А., Дашиев Б.Г.; подготовка иллюстративного материала – Лабыгина А.В.; статистическая обработка материала – Дашиев Б.Г.; написание текста – Курашова Н.А.; редактирование – Колесников С.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Курашова Надежда Александровна, e-mail: nakurashova@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках госбюджетной темы «Патофизиологические механизмы и генетико-метаболические предикторы сохранения репродуктивного здоровья и долголетия в различных возрастных, гендерных и этнических группах» (FGMZ-2021-0001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.04.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Kurashova N.A., Dashiev B.G., Kolesnikov S.I., Labygina A.V., Kolesnikova L.I.

Oxidative stress and parameters of spermatogenesis in men with idiopathic infertility before and after the treatment with ethylmethylhydroxypyridine malate

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems,
16 Timiryazeva str., Irkutsk, 664003, Russian Federation

Oxidative stress is presently recognized as an important factor contributing to the development of various forms of male infertility, including idiopathic. Modern studies are characterized by high heterogeneity, and, thus, convincing conclusions about the effect of antioxidants (AO) on ejaculate parameters are not yet available. Aim: to evaluate changes in the main parameters of the ejaculate and the state of the LP-AO defense (AOD) system in men with idiopathic infertility during the treatment with an AO ethylmethylhydroxypyridine malate.

Methods. Data of examination of men ($n=225$) from infertile couples were retrospectively analyzed to identify men with idiopathic infertility. The control group consisted of practically healthy men with realized reproductive function. The ejaculate was studied in accordance with 2021 WHO Guidelines. Parameters of the LP system and AOD were determined in the ejaculate using generally accepted spectrophotometric and fluorometric methods.

Results. After a 1 month of the ethylmethylhydroxypyridine malate treatment, the count of sperm with progressive motility was increased in the ejaculate of infertile men, in contrast to the patients who did not take this drug. In the ejaculate of men not treated with the AO drug, there were no significant changes in the parameters of the LP-AOD system. In the ejaculate of men with idiopathic infertility after the AO drug treatment, LP indicators were significantly decreased while the power of the AO system was enhanced as evident from the increased concentration of SOD and total AO activity.

Conclusion. The study demonstrated that the AO drug, ethylmethylhydroxypyridine malate, can increase the sperm concentration and motility and reduce oxidative processes in the ejaculate of men with idiopathic infertility.

Keywords: idiopathic male infertility; oxidative stress; antioxidants; ethylmethylhydroxypyridine malate; sperm

For citation: Kurashova N.A., Dashiev B.G., Kolesnikov S.I., Labygina A.V., Kolesnikova L.I. Oxidative stress and parameters of spermatogenesis in men with idiopathic infertility before and after the treatment with ethylmethylhydroxypyridine malate. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 23-30. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.23-30

Author's contribution: research concept and design – Kolesnikova L.I.; material collecting and processing – Kurashova N.A., Dashiev B.G.; preparation of illustrative material – Labygina A.V.; statistical processing – Dashiev B.G.; writing the text – Kurashova N.A.; editing the text – Kolesnikov S.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

For correspondence: Kurashova Nadezhda A., nakurashova@yandex.ru

Information about the authors:

Kurashova N.A., <https://orcid.org/0000-0001-8591-8619>

Dashiev B.G., <https://orcid.org/0000-0003-2698-0687>

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

Labygina A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8190-6143>

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

Financing. The study was carried out within the framework of the state budget theme "Pathophysiological mechanisms and genetic-metabolic predictors of maintaining reproductive health and longevity in various age, gender and ethnic groups" (FGMZ-2021-0001).

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

Received 23.04.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Окислительный стресс, возникающий в результате усиления свободнорадикальных процессов и снижения буферной емкости антиоксидантной защиты (АОЗ), является ключевым звеном множества патологических состояний, таких как воспаление, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, сахарный диабет, синдром обструктивного апноэ сна, репродуктивные нарушения различного генеза [1–6]. Процесс свободнорадикального окисления имеет

определенную специфичность проявлений не только в зависимости от характера патологии, но и от возраста, гендерной и этнической принадлежности пациента [3, 5, 7, 8].

Бесплодие является актуальной проблемой здравоохранения во всем мире. Согласно данным ВОЗ, бесплодием страдает около 17,5% взрослого населения, то есть примерно каждый шестой человек в мире. В 50% случаев ухудшение возможности зачатия в бесплодных па-

Методика

рах обусловлено мужским фактором, из которых только мужской вклад в бесплодие встречается в 20-30% [9, 10]. Снижение оплодотворяющей способности эякулята зависит от многих причин: от генетических до факторов образа жизни и ятрогенных. Спермограмма, как первоначальный этап оценки мужчины, не всегда отражает возможность зачатия и живорождения плода и не разграничивает фертильных мужчин от бесплодных. И наоборот, нарушенные показатели эякулята не предполагают отсутствие фертильности, так как эти мужчины могут иметь здорового ребенка. В последнее время появились другие методы исследования, выявляющие возможные причины мужского фактора бесплодия, не выявляемые при обычном анализе эякулята [11, 12]. ОС по данным ряда авторов играет значимую роль в 25-87% случаев мужского фактора бесплодия [13]. Применение антиоксидантов (АО) для уменьшения избытка АФК является возможностью улучшения качества эякулята. Предполагается, что АО добавки влияют на повышение частоты зачатия и живорождения, и также снижение частоты потери беременности [14]. В данное время нет однозначного ответа пользы или вреда применения добавок АО для репродуктивного потенциала мужчины. В то же время для лечения мужского бесплодия широко используют АО, которые представляют собой природные или синтетические биомолекулы, препятствующие повреждению клеток вследствие ОС. Внимание исследователей привлек 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина малат, соединение яблочной кислоты. Результаты сравнительных клинических исследований свидетельствуют в пользу более высокой биодоступности и эффективности малатов по сравнению с сукцинатами [15]. Малат легко проникает через гематоэнцефалический барьер [16]. Этилметилгидроксипиридина малат (Этоксидол) является одним из немногих зарегистрированных антиоксидантных препаратов, разрешенных к применению в медицинской практике. Благодаря фармакологическому синергизму компонентов препарата обеспечиваются интенсификация процессов клеточного метаболизма и обмена веществ, окислительно-восстановительных процессов, регенерация клеток, нормализация липидного обмена. Он ингибирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), повышает активность супероксиддисмутазы (СОД) и соотношение липид/белок, уменьшает вязкость мембраны, увеличивая ее текучесть [16].

В связи с вышеизложенным, целью исследования явилась оценка изменений основных параметров эякулята и состояния системы ПОЛ-АОЗ при применении этилметилгидроксипиридина малата у мужчин с идиопатическим бесплодием.

Ретроспективно проведен анализ результатов обследования мужчин ($n=225$), из бесплодных супружеских пар, проходивших обследование и лечение на базе ГАУЗ Республиканский перинатальный центр МЗ РБ (г. Улан-Удэ, Бурятия) и ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (г. Иркутск). Была сформирована группа мужчин с идиопатическим бесплодием ($n=70$), из которых 30 мужчин принимали антиоксидантный препарат этилметилгидроксипиридина малат (Этоксидол) в качестве антиоксидантной коррекции, и 40 мужчин придерживались здорового образа жизни без применения антиоксидантного препарата. По возрасту, росту-весовым показателям группы исследования были сопоставимы. Форма выпуска препарата Этоксидол – таблетки жевательные белого или белого с кремоватым оттенком цвета, круглые, плоскоцилиндрические (производитель Россия). Пациенты принимали антиоксидантный препарат в течение 30 дней по 100 мг (1 таблетка) три раза в день во время еды.

Критерии включения пациентов в исследование: отсутствие беременности в паре более 12 мес при регулярной половой жизни без контрацепции; наличие патозооспермии у мужчины; нормальное развитие наружных половых органов по данным физикального обследования. Критерии включения в контрольную группу: наличие у партнерши в анамнезе беременности, закончившейся родами в течение последних 2-х лет; нормозооспермия. Критериями исключения: возраст младше 20 или старше 45 лет; грубая патология эякулята: азооспермия, криптозооспермия, некрозооспермия; психосексуальная и эякуляторная дисфункции; наличие активных воспалительных процессов; лабораторные признаки воспалительных изменений придаточных половых желез; установленные генетические причины бесплодия (синдром Клайнфельтера, AZF-делеции, CFTR-мутации, мутационные изменения числа CAG-повторов в андрогеновом рецепторе AR, первичная цилиарная дискинезия, дисплазия фиброзной оболочки жгутиков сперматозоидов, глобулозоосперия, синдром ацефалических сперматозоидов); гипергонадотропный или гипогонадотропный гипогонадизм; варикоцеле; наличие иммунной формы бесплодия (MAR-test IgG > 50%); наличие выраженной соматической патологии.

Все пациенты подписывали информированное добровольное согласие на участие в исследовании в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of

Helsinki (последний пересмотр Форталеза, Бразилия, октябрь 2013)). Исследование одобрено комитетом по био-медицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (выписка из протокола заседания № 5 от 07.11.2019 г.).

Клиническое обследование проведено всем мужчинам, давшим письменное разрешение на включение в исследование, что предполагало: сбор жалоб и анамнеза, физикальное обследование, лабораторную и инструментальную диагностику согласно клиническим рекомендациям «Мужское бесплодие» Российского общества урологов. Исследования эякулята проводили в соответствии с Руководством ВОЗ (2021).

В качестве материала для биохимических исследований использовали эякулят. Образец спермы, оставшийся после проведения анализа спермограммы, хранили при температуре – 80°C до проведения анализа. Размораживание эякулята проводилось в течение 1 часа при температуре 22–25°C, непосредственно перед анализом.

Содержание компонентов системы ПОЛ–АОЗ определяли в эякуляте общепринятыми спектрофотометрическими и флуориметрическими методами. Регистрацию оптических плотностей и флуоресценции проводили на спектрофотометре BTS-350 (Испания), спектрофотометре СФ-2000 (Россия) и флюорате 02 АБФФ-Т (Россия).

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических и прикладных программ STATISTICA 6.1 StatSoft Inc., США. Для определения близости к нормальному закону распределения количественных признаков использовали визуально-графи-

ческий метод и критерии согласия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. Проверка равенства генеральных дисперсий осуществлялась с помощью критерия Фишера (F-test). Вследствие того, что выборка характеризовалась преимущественно неправильным распределением, оценку различий количественных показателей между изучаемыми группами проводили непараметрическими методами статистического анализа: для сравнения двух зависимых переменных с использованием критерия Уилкоксона. Данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартилей. Различия сравниваемых показателей считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск).

Результаты

Исходя из клинических рекомендаций «Мужское бесплодие» Российского общества урологов, всем пациентам с идиопатическим мужским бесплодием для улучшения показателей эякулята и повышения вероятности зачатия рекомендовано соблюдение здорового образа жизни. У мужчин с бесплодием, выполнявших рекомендации по здоровому образу жизни и не принимавших этилметилгидроксипиридина малат, в спермограмме выявлено значимое повышение количества морфологически нормальных сперматозоидов (табл. 1). Остальные показатели спермограммы оставались неизменными.

Таблица 1/ Table 1

Показатели спермограммы мужчин с идиопатическим бесплодием, не принимавших этилметилгидроксипиридина малат
Spermogram indicators of men with idiopathic infertility who did not take ethylmethylhydroxy pyridine malate

Показатели	В начале (n=40)	Через 1 мес (n=40)	Уровень значимости
	Mediana [Q1; Q3]		
Объем эякулята, мл	3,4[2,0; 4,5]	3,6[1,9; 4,9]	$P_w > 0,05$
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	56,3[30,8; 78,5]	45,0[26,0; 79,4]	$P_w > 0,05$
Подвижность общая, %	42,9[16,3; 52,8]	47,5[32,5; 54,0]	$P_w > 0,05$
Подвижность прогрессивная PR (a+b), %	31,5[11,8; 43,0]	36,3[18,0; 40,8]	$P_w > 0,05$
Подвижность (a), %	14,6[2,8; 25,8]	16,8[5,5; 20,8]	$P_w > 0,05$
Подвижность (b), %	14,3[5,8; 16,3]	15,0[7,4; 20,7]	$P_w > 0,05$
Жизнеспособность, %	57,0[50,5; 63,5]	56,5[49,0; 63,5]	$P_w > 0,05$
Нормальная морфология, %	8,5[6; 11]	10[7; 12]	$P_w < 0,05$

Примечание. P_w – уровень значимости критерия Уилкоксона (непараметрический критерий для сравнения двух зависимых переменных).
Note. P_w – level of significance of the Wilcoxon test (non-parametric test for comparing two dependent variables).

В эякуляте мужчин, не принимавших этилметилгидроксипиридина малат, не выявлено значимых изменений показателей ПОЛ-АОЗ (табл. 2).

В ходе анализа полученных результатов через 1 месяц приема препарата этилметилгидроксипиридина малата установлено существенное повышение подвижности сперматозоидов за счет более высокого подъема прогрессивной подвижности (категория PR) на 67%, выявлено значимое увеличение числа нормальных форм сперматозоидов на 22%, повышение числа живых клеток на 13% (табл. 3).

После приема этилметилгидроксипиридина малата в эякуляте у мужчин с идиопатическим бесплодием выявлено значимое снижение уровня диеновых конъюгатов на 15%) и повышение АОА на 38% и активности СОД на 9% (табл. 4).

югатов на 15%) и повышение АОА на 38% и активности СОД на 9% (табл. 4).

Обсуждение

Окислительный стресс (ОС) в настоящее время признан важным фактором патогенеза многих патологических состояний, в числе которых различные формы мужского бесплодия, включая идиопатическое [17–20]. Параметры спермы можно контролировать, чтобы определить, оказывает ли назначенное лечение положительный эффект на повышение шансов супругов на зачатие. Последний систематический обзор базы данных Кокрейна показал, что современные исследования характеризуются высокой гете-

Таблица 2/ Table 2

Показатели ПОЛ-АОЗ в эякуляте мужчин с идиопатическим бесплодием, не принимавших этилметилгидроксипиридина малат
LP-AOD indicators in the ejaculate of men with idiopathic infertility who did not take ethylmethylhydroxypyridine malate

Показатели	В начале (n=40)	Через 1 мес (n=40)	Уровень значимости
	Mediana [Q1; Q3]		
Дв. св., у.е.	2,08[1,58; 2,98]	2,11[1,49; 2,79]	$P_w > 0,05$
ДК, мкмоль/л	1,29[0,84; 1,69]	1,14[0,77; 1,61]	$P_w > 0,05$
КД и СТ, у.е.	0,65[0,47; 1,33]	0,59[0,36; 1,12]	$P_w > 0,05$
ТБК-АП, мкмоль/л	1,11[0,77; 1,5]	1,14[0,81; 1,54]	$P_w > 0,05$
АОА, у.е.	4,04[2,75; 6,34]	2,8[2,23; 4,54]	$P_w > 0,05$
α-токоферол, мкмоль/л	3,62[2,79; 4,73]	4,05[2,55; 5,42]	$P_w > 0,05$
СОД, у.е.	1,37[1,31; 1,46]	1,39[1,3; 1,47]	$P_w > 0,05$
GSH, ммоль/л	1,91[1,41; 2,47]	2,11[1,6; 2,42]	$P_w > 0,05$
GSSG, ммоль/л	1,72[1,58; 1,98]	1,72[1,52; 2,04]	$P_w > 0,05$

Таблица 3/ Table 3

Показатели спермограммы мужчин с идиопатическим бесплодием до и после приема этилметилгидроксипиридина малата
Spermogram indicators of men with idiopathic infertility before and after taking ethylmethylhydroxypyridine malate

Показатели	До приема (n=30)	После приема (n=30)	Уровень значимости
	Mediana [Q1; Q3]		
Объем эякулята, мл	3,4[2,5; 4,4]	3,5[2,6; 4,6]	$P_w > 0,05$
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	65,6[23,7; 105,1]	74,8[34; 94,1]	$P_w > 0,05$
Подвижность общая, %	42,3[21,4; 50,5]	50[36,5; 57,9]	$P_w < 0,05$
Подвижность прогрессивная PR (a+b), %	18,4[4,9; 33,3]	30,7[13,2; 44]	$P_w < 0,05$
Подвижность (a), %	7,2[1,3; 16,8]	12,5[3,9; 27]	$P_w < 0,05$
Подвижность (b), %	8,5[3,1; 13,4]	12,8[8,9; 18,8]	$P_w < 0,05$
Жизнеспособность, %	58 [53; 61]	65,5[59; 76]	$P_w < 0,05$
Нормальная морфология, %	9 [8; 11]	11 [10; 13]	$P_w < 0,05$

рогенностью и убедительные выводы относительно влияния антиоксидантов (АО) на параметры эякулята, в частности, на концентрацию, общую и прогрессивную подвижность сперматозоидов, пока не представлены [14].

Ранее нами уже было показано, что одним из механизмов патогенеза репродуктивных нарушений у мужчин является развитие ОС с накоплением ТБК-активных продуктов на фоне снижения активности СОД [6, 7]. У перенёсших Covid-19 мужчин отмечали нарастание нарушений сперматогенеза и сдвиги в сторону преобладания прооксидантных факторов. После курсового приёма антиоксидантного комплекса у пациентов отмечалось восстановление окислительно-восстановительного баланса, увеличение подвижности сперматозоидов и снижение лейкоспермии [21].

В данном исследовании продемонстрировано, что после месячного приема препарата этилметилгидроксипиридина малата в эякуляте бесплодных мужчин происходит увеличение числа сперматозоидов с прогрессивной подвижностью в отличие от пациентов, не принимавших данный препарат. Также после приема антиоксидантного препарата в эякуляте мужчин с идиопатическим бесплодием установлено статистически значимое снижение показателей ПОЛ на фоне повышения мощности антиоксидантной системы, выражающееся в достоверном повышении уровня СОД и АОА, что свидетельствует об эффективном снижении выраженности ОС в эякуляте у мужчин с идиопатическим бесплодием.

Хотя некоторые АО, такие как витамин С, коэнзим Q10, мелатонин, L-карнитин и глутатион, проде-

монстрировали уменьшение ОС и улучшение качества спермы, не достигнут научный консенсус относительно их окончательной эффективности в плане успешного зачатия и деторождения у бесплодных супружеских пар из-за различных проблем в методологиях исследований [22, 23]. В то же время, по данным метаанализа Agarwal A. и соавт. (2023), лечение АО (как моно, так и в сочетании) значительно улучшило концентрацию сперматозоидов, прогрессивную и общую подвижность, а также морфологию сперматозоидов. Использование АО в целом оказывает положительное влияние на параметры анализа спермы, независимо от используемой добавки [23].

Было доказано, что употребление растительной диеты с высоким потреблением растительного белка, антиоксидантов, фруктов, овощей, орехов, бобовых, оливкового масла и достаточным потреблением клетчатки связано с улучшением фертильности [24].

В то же время, часто из-за неточного определения ОС в случаях мужского бесплодия антиоксидантная терапия становится у пациентов произвольной и приводит к чрезмерному использованию антиоксидантов. Это может вызвать «редуктивный стресс» – снижение уровня АФК ниже их физиологического уровня, критического для нормального функционирования сперматозоидов. В свою очередь «редуктивный стресс» может также вызывать компенсаторную более высокую выработку АФК, что, в свою очередь, вызывает ОС. Это явление может частично объяснить «антиоксидантный парадокс» [25].

Таблица 4/ Table 4

Показатели ПОЛ-АОЗ в эякуляте мужчин с идиопатическим бесплодием до и после приема этилметилгидроксипиридина малата
LP-AOD indicators in the ejaculate of men with idiopathic infertility before and after taking ethylmethylhydroxypyridine malate

Показатели	До приема (n=30)	После приема (n=30)	Уровень значимости
	Mediana [Q1; Q3]		
Дв. св., у.е.	1,71 [1,38; 2,03]	1,63 [1,38; 1,8]	$P_w > 0,05$
ДК, мкмоль/л	1,46 [1,08; 1,66]	1,24 [1,04; 1,54]	$P_w < 0,05$
КД и СТ, у.е.	0,39 [0,33; 0,46]	0,4 [0,27; 0,53]	$P_w > 0,05$
ТБК-АП, мкмоль/л	1,58 [1,03; 1,99]	1,56 [0,83; 2,08]	$P_w > 0,05$
АОА, у.е.	6,39 [5,15; 7,97]	9,05 [7,09; 12,8]	$P_w < 0,05$
α-токоферол, мкмоль/л	7,31 [5,88; 9,34]	7,66 [6,81; 8,56]	$P_w > 0,05$
СОД, у.е.	1,16 [1,09; 1,18]	1,25 [1,18; 1,29]	$P_w < 0,05$
GSH, ммоль/л	2,21 [2,05; 2,43]	2,22 [1,97; 2,58]	$P_w > 0,05$
GSSG, ммоль/л	1,95 [1,73; 2,11]	1,99 [1,58; 2,15]	$P_w > 0,05$

Заклучение

Поиск и разработка способов коррекции окислительного стресса являются крайне актуальной проблемой современной медицины. Одним из способов, который может быть эффективен в клинических условиях, является применение веществ, обладающих широким спектром антиокислительного действия, так называемых антиокислителей. В результате нашего исследования установлено, что антиокислительный препарат этилметилгидроксипиридина малат оказывает положительное влияние на концентрацию и подвижность сперматозоидов, а также снижает окислительные процессы в эякуляте мужчин с идиопатическим бесплодием.

Литература

(п.п. 4; 5; 9-15; 17-25 см. References)

1. Даренская М.А., Беленькая Л.В., Аталян А.В., Данусевич И.Н., Лазарева Л.М., Наделяева Я.Г. и др. Особенности реакций окислительного стресса у женщин репродуктивного возраста с метаболическим синдромом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022; 174(11): 555-9. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-11-555-559>
2. Даренская М.А., Чугунова Е.В., Колесников С.И., Гребенкина Л.А., Семенова Н.В., Никитина О.А. и др. Уровень маркеров окислительного повреждения липидов и ДНК у мужчин с сахарным диабетом 1 типа и разным уровнем альбуминурии. *Сахарный диабет*. 2022; 25(2): 120-7. <https://doi.org/10.14341/DM12765>
3. Семенова Н.В., Бричагина А.С., Никитина О.А., Мадаева И.М., Колесников С.И., Колесникова Л.И. Параметры карбонильного стресса и окислительная модификация ДНК при возрастной менопаузе у женщин русской и бурятской этнических групп. *Экология человека*. 2022; 6: 415-23. <https://doi.org/10.17816/humeco105578>
6. Колесникова Л.И., Курашова Н.А., Гребенкина Л.А., Лабыгина А.В., Сутурина Л.В., Дашиев Б.Г. и др. Метаболические аспекты нарушения репродуктивного здоровья мужчин. В сборнике: *Мужское здоровье. Сборник научных трудов VII Российского конгресса с международным участием*. 2011: 277-8.
7. Курашова Н.А., Дашиев Б.Г., Колесникова Л.И. Этнические особенности антиокислительного статуса у мужчин с бесплодием. *Экология человека*. 2022; 10: 699-707. <https://doi.org/10.17816/humeco105642>
8. Даренская М.А., Рычкова Л.В., Колесников С.И., Семенова Н.В., Колесникова Л.И. Интегральная оценка неспецифических реакций липопероксидации крови у девушек-подростков - представительниц сибирских этносов. *Экология человека*. 2023; 1: 29-39. <https://doi.org/10.17816/humeco105586>
16. Дадашева М.Н., Тараненко Н.Ю., Агафонов Б.В., Чудаков С.Ю. Патогенетическая терапия новым отечественным антиокислителем Этоксидолом при цереброваскулярной болезни. *Вестник семейной медицины*. 2015; 1-2: 12-6.

References

1. Darenskaja M.A., Belen'kaja L.V., Ataljan A.V., Danusevich I.N., Lazareva L.M., Nadeljaeva Ja.G., et al. Oxidative stress reactions in

women of reproductive age with metabolic syndrome. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2022; 174(11): 555-9. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-11-555-559> (in Russian)

2. Darenskaja M.A., Chugunova E.V., Kolesnikov S.I., Grebenkina L.A., Semenova N.V., Nikitina O.A., et al. Markers of oxidative damage lipids and DNA in men with type 1 diabetes mellitus and different levels of albuminuria. *Sakharnyy diabet*. 2022; 25(2): 120-7. <https://doi.org/10.14341/DM12765> (in Russian)
3. Semenova N.V., Brichagina A.S., Nikitina O.A., Madaeva I.M., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I. carbonil stress parameters and DNA oxidative modification in russian and buryat women with age-related menopause. *Ekologiya cheloveka*. 2022; 6: 415-23. <https://doi.org/10.17816/humeco105578> (in Russian)
4. Semenova N.V., Madaeva I.M., Brichagina A.S., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as an oxidative stress marker in insomnia. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 171(3): 384-7. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05233-0> (in Russian)
5. Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Kurashova N.A., Osadchuk L.V., Osadchuk A.V., Dolgikh M.I., et al. Reproductive health and peculiarities of lipid peroxidation-antioxidant defense system in men of the main ethnic groups of the Baikal region. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 160(1): 32-4. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3091-6> (in Russian)
6. Kolesnikova L.I., Kurashova N.A., Grebenkina L.A., Labygina A.V., Sutura L.V., Dashiev B.G., et al. *Metabolic aspects of reproductive health disorders in men. [V sbornike: Muzhskoe zdorov'e. Sbornik nauchnykh trudov VII Rossiyskogo kongressa s mezhdunarodnym uchastiem]*. 2011: 277-8. (in Russian)
7. Kurashova N.A., Dashiev B.G., Kolesnikova L.I. Ethnic features of antioxidant status in men with infertility. *Ekologiya cheloveka*. 2022; 10: 699-707. <https://doi.org/10.17816/humeco105642> (in Russian)
8. Darenskaja M.A., Rychkova L.V., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Kolesnikova L.I. Integral assessment of non-specific lipid peroxidation reactions blood in adolescent girls of the siberian ethnos. *Ekologiya cheloveka*. 2023; 1: 29-39. <https://doi.org/10.17816/humeco105586> (in Russian)
9. Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., Dyer S., Racowsky C., de Mouzon J., Sokol R., et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *FertilSteril*. 2017; 108(3): 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
10. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015; 13: 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
11. Fainberg J., Kashanian J.A. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-670. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
12. Agarwal A., Majzoub A. Laboratory tests for oxidative stress. *Indian J Urol*. 2017; 33(3): 199-206. https://doi.org/10.4103/iju.IJU_9_17
13. Kumar N., Singh A.K. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2018; 47(10): 565-72. <https://doi.org/10.1016/j.jogh.2018.06.008>
14. de Ligny W., Smits R.M., Mackenzie-Proctor R., Jordan V., Fleischer K., de Bruin J.P., et al. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022; 5(5): CD007411. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007411.pub5>
15. Smits R.M., Mackenzie-Proctor R., Yazdani A., Stankiewicz MT., Jordan V., Showell M.G. Antioxidants for male subfertility.

- Cochrane Database Syst Rev.* 2019; 3(3): CD007411. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007411.pub4>
16. Dadasheva M.N., Taranenko N.Ju., Agafonov B.V., Chudakov S.Ju. Pathogenetic therapy with the new domestic antioxidant ethoxidol for cerebrovascular disease. *Vestnik semeinoy meditsiny.* 2015; 1-2: 12-6. (in Russian)
 17. Björndahl L., Kirkman Brown J.; other Editorial board members of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. *FertilSteril.* 2022; 117(2): 246-51. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.12.012>
 18. Aitken R.J. Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33(12): 1691-2. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0791-4>
 19. Bui A.D., Sharma R., Henkel R., Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia.* 2018; 50(8): e13012. <https://doi.org/10.1111/and.13012>
 20. Wagner H., Cheng J.W., Ko E.Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J Urol.* 2017; 16(1): 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
 21. Kurashova N.A., Dashiev B.G., Kolesnikov S.I., Dmitrenok P.S., Kozlovskaya E.P., Kasyanov S.P., et al. Changes in spermatogenesis, lipoperoxidation processes, and antioxidant protection in men with pathozoospermia after COVID-19. The effectiveness of correction with a promising antioxidant complex. *Bull Exp Biol Med.* 2022; 173(5): 606-10. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05596-y>
 22. Kaltsas A. Oxidative stress and male infertility: the protective role of antioxidants. *Meditsina (Kaunas).* 2023; 59(10): 1769. <https://doi.org/10.3390/medicina59101769>
 23. Agarwal A., Cannarella R., Saleh R., Harraz A.M., Kandil H., Salvio G., et al. Impact of antioxidant therapy on natural pregnancy outcomes and semen parameters in infertile men: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Mens Health.* 2023; 41(1): 14-48. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220067>
 24. Łakoma K., Kukharuk O., Śliż D. The influence of metabolic factors and diet on fertility. *Nutrients.* 2023; 15(5): 1180. <https://doi.org/10.3390/nu15051180>
 25. Dutta S., Sengupta P., Roychoudhury S., Chakravarthi S., Wang C.W., Slama P. Antioxidant paradox in male infertility: 'A Blind Eye' on inflammation. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(1): 167. <https://doi.org/10.3390/antiox11010167>

Сведения об авторах:

Курашова Надежда Александровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патофизиологии репродукции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ;

Дашиев Баир Гомбоевич, канд. мед. наук, врач уролог-андролог, мл. науч. сотр., лаб. патофизиологии репродукции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ;

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

Лабыгина Альбина Владимировна, доктор мед. наук, науч. сотр., лаб. гинекологической эндокринологии ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ;

Колесникова Любовь Ильинична, акад. РАН, доктор мед. наук, проф., науч. руководитель ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, e-mail: kolesnikova20121@mail.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616.72-002.772

Степанов Е.А., Баясхаланова Ц.Б., Фефелова Е.В., Степанов А.В., Терешков П.П., Степанова М.О., Цыбилов Н.Н.**Белок S100 и метаболиты триптофана в развитии ревматоидного артрита**ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России,
672000, Чита, ул. Горького, д. 39а

Введение. До настоящего времени остаются не выясненными многие звенья патогенеза ревматоидного артрита, что приводит к неудовлетворительным показателям при его терапии. **Цель исследования** – изучение изменений уровня белка S100 и метаболитов триптофана при моделировании ревматоидного артрита.

Методика. Опыты были проведены на 40 крысах Wistar. В начале исследования каждому животному экспериментальных групп была выполнена внутривенная инъекция раствора коллагена 2 типа (Chondrex, Inc., США) в неполном адьюванте Фрейнда. В тканях определяли содержание триптофана (TRP), кинуренина, 3-гидрокинуренина, L-5-гидротриптофана методом ВЭЖХ с флуориметрической и спектрофотометрической детекцией. Белок S100 определяли стрептавидин-биотин-пероксидазным методом. Концентрацию хемокинов: C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) и chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) определяли, используя наборы для мультиплексного анализа Rat Inflammation Panel V02 (Biolegend, США). с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Статистический анализ проводили с помощью программы Jami версия 2.3.

Результаты. Было установлено, что содержание CXCL1 резко возрастает только в ранние сроки экспериментального ревматоидного артрита, концентрация CCL2 была высокой на всем протяжении эксперимента. Уровень белка S100 был постоянно высоким при данной патологии. При экспериментальном ревматоидном артрите повышается содержание метаболитов триптофана по кинурениновому пути и снижается концентрация метаболитов по серотониновому пути. Установлены прямые положительные корреляционные связи белка S100 с содержанием метаболитов триптофана по кинурениновому пути и отрицательные по серотониновому пути.

Выводы. Белок S100, хемокины и метаболиты триптофана играют важную роль в патогенезе ревматоидного артрита.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; белок S100; метаболиты триптофана; хемокины

Для цитирования: Степанов Е.А., Баясхаланова Ц.Б., Фефелова Е.В., Степанов А.В., Терешков П.П., Степанова М.О., Цыбилов Н.Н. Белок S100 и метаболиты триптофана в развитии ревматоидного артрита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 31-36.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.31-36

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Степанов Е.А.; сбор и обработка материала – Баясхаланова Ц.Б.; статистическая обработка материала – Фефелова Е.В.; написание текста – Степанов А. В.; окончательное утверждение для публикации – Цыбилов Н.Н.; подготовка иллюстративного материала – Терешков П.П.; редактирование – Степанова М.О. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех ее частей – все соавторы.

Для корреспонденции: Степанов Евгений Александрович, e-mail: eugen3-stepanov@ya.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.05.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Stepanov E.A., Bayaskhalanova Ts.B., Fefelova E.V., Stepanov A.V., Tereshkov P.P., Stepanova M.O., Tsybikov N.N.**S100 protein and tryptophan metabolites in rheumatoid arthritis**Chita State Medical Academy, 39a Gorky Street,
Chita, 672000, Russian Federation

Introduction. To date, many links in the pathogenesis of rheumatoid arthritis remain unclear, which leads to unsatisfactory results in its therapy. **The aim of the research.** Study of S100 protein changes and tryptophan metabolites in rheumatoid arthritis.

Methods. Experiments were performed on 40 Wistar rats. At baseline, an intraperitoneal injection of type 2 collagen solution (Chondrex, Inc., USA) in Freund's incomplete adjuvant was performed on each animal of the experimental groups. The tissues were tryptophan, kynurenine, 3-hydroxynurinine, L-5-hydroxytryptophan by HPLC with fluorimetric and spectrophotometric detection. The S100 protein was determined by streptavidin-biotin-peroxidase. Chemokine concentrations of C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) were determined using Rat Inflammation Panel V02 multiplex assay

kits (Biolegend, USA). using a Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, USA). Statistical analysis was performed using Jamovi version 2.3.

Results. It was found that the content of CXCL1 increases sharply in the early stages of experimental rheumatoid arthritis, the concentration of CCL2 was high throughout the experiment. The level of S100 protein was consistently high in this pathology. With experimental rheumatoid arthritis, the content of tryptophan metabolites along the kynurenine pathway increases and the concentration of metabolites along the serotonin pathway decreases. Direct positive correlations of the S100 protein with the content of tryptophan metabolites along the kynurenine pathway and negative ones along the serotonin pathway were established.

Conclusions. S100 protein, chemokines, and tryptophan metabolites play important roles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Keywords: rheumatoid arthritis; S100 protein; tryptophan metabolites; chemokines

For citation: Stepanov E.A., Bayaskhalanova Ts.B., Fefelova E.V., Stepanov A.V., Tereshkov P.P., Stepanova M.O., Tsybikov N.N. S100 protein and tryptophan metabolites in rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 31-36. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.31-36

Author's contribution: concentration and study design – Stepanov E.A.; collection and processing of material – Bayaskhalanova Ts.B.; statistical processing of material – Fefelova E.V.; writing the text – Stepanov A.V.; preparation of illustrative material – Tereshkov P.P.; editing the text – Stepanova M.O.; final approval for publication – Tsybikov N.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Evgeny A. Stepanov*, Graduate student of the Department of Pathological Physiology of the Chita State Medical Academy, e-mail: eugen3-stepanov@ya.ru

Information about the authors:

Bayaskhalanova Ts.B., <https://orcid.org/0000-0002-3926-3014>

Fefelova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Stepanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4385-3578>

Tereshkov P.P., <https://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Stepanova M.O., <https://orcid.org/0009-0007-4636-7288>

Tsybikov N.N., <https://orcid.org/0000-0002-0975-2351>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 03.05.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное заболевание с развитием хронического воспаления, поражающего суставы и периферические ткани, такие как скелетные мышцы и кости. РА остается одной из значимых причин инвалидности и трудовых потерь, поражая около 0,2-1% населения планеты. Хотя лечение противоревматическими препаратами эффективно контролирует воспаление и уменьшает разрушение костей, общие показатели ремиссии РА по-прежнему остаются на низком уровне. Поэтому, выяснение особенностей патогенеза РА крайне необходимо [1].

Белок S100, вырабатываемый нейтрофилами и моноцитами участвует в процессе развития воспаления, в том числе играет важную роль при аутоиммунных заболеваниях [2]. Высокий уровень белка S100 в сыворотке связан с худшими исходами при РА и кроме того он может предсказать рецидив заболевания [3].

Производные триптофана, проявляют иммуномодулирующие свойства, которые могут, как усугублять, так и облегчать воспаление при РА [4]. При воспалительном артрите и связанных с ним заболеваниях кинуренин защищает от развития заболевания, а ингибирование или удаление индоламин-2,3-диоксигеназы увеличивает его тяжесть. Данные по участию метаболитов триптофана в развитии РА являются довольно противоречивыми [5]. **Цель исследования** — выявление изменений уровня белка S100 и метаболитов триптофана при моделировании ревматоидного артрита.

Методика

Исследование было проведено на 40 крысах Wistar, средний возраст особей — 18-20 недель, вес — 200-300 г. В ходе эксперимента животные были разделены на 4 группы, три из которых экспериментальные, последняя интактная. В начале исследования каждому животному экспериментальных групп

была выполнена внутривенная инъекция раствора коллагена 2 типа (Chondrex, Inc., США) в неполном адьюванте Фрейнда. Это стандартный вариант вызвать экспериментальный ревматоидный артрит [6].

Животные содержались в стандартных условиях вивария, оборудованного в соответствии с санитарными требованиями № 1045–73 от 06.04.73, получали стандартный корм и воду без ограничения. Эксперимент проводили на минимальном количестве животных в соответствии с требованиями «Международных рекомендаций по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», принятыми Международным Советом Медицинских Научных Обществ (СИУС) в 1985 г. По окончании эксперимента животных забивали передозировкой фторотанового наркоза. Протокол локального этического комитета № 124 от 10.11. 2022 г.

Выведение животных из эксперимента осуществляли на 7, 14, 21 дни, далее осуществляли забор материала (суставная сумка) на морфологическое и иммуногистохимическое исследование. Оценку содержания метаболитов триптофана у животных, выведенных из эксперимента, выполняли путем забора хрящевой ткани в области коленных суставов, после чего полученный материал взвешивали и пропорционально весу добавляли фосфатный буферный раствор. Затем осуществляли гомогенизацию при помощи гомогенизатора QIAGEN TISSUELYSER LT. В тканях определяли содержание триптофана (TRP), кинуренин (KYN), 3-гидрокинуренин (ЗНКYN), L-5-гидротриптофан (5HTp) методом ВЭЖХ с флуориметрической и спектрофотометрической детекцией.

Иммуногистохимическое окрашивание проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом. Срезы тканей всех исследуемых групп окрашивали кроличьими моноклональными антителами (SP7) (abcam, 16669, Кембридж, Великобритания) в разведении 1:100. Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм погружали в ксилол для удаления парафина. Дегидратацию проводили в спирте убывающей степени, а затем дважды промывали дистиллированной водой в течение пяти минут. Эндогенные пероксидазы блокировали применением 5% перекиси водорода в течение десяти минут. Извлечение антигена и разведение антител проводили в соответствии с инструкциями производителя. Срезы инкубировали с первичным антителом (к белку S100) в течение 60 мин при 25°C, затем промывали и вновь инкубировали в течение 30 мин с биотинилированным вторичным антителом. В качестве хромогена использовали 3'-диаминобензидин (Dako, Glostrup, Дания) при pH 7,0 в течение 3-х мин.

Срез отрицательного контроля из каждой группы инкубировали с фосфатно-солевым буфером (PBS) без добавления первичных антител. Экспрессию антигенов определяли на 100 клеток в 10 полях зрения в зоне гистологических изменений.

Концентрацию хемокинов C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) и chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) определяли, используя наборы для мультиплексного анализа Rat Inflammation Panel V02 (Biolegend, США) с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ проводили с помощью программы Jamovi версия 2.3. Перед началом анализа вариационные ряды тестировались на нормальность, при помощи критерия Шапиро–Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального, полученные данные представлены в виде медианы, межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентилей). Сравнение количественных признаков выполняли с применением критерия Краскела–Уоллиса (H). При наличии статистически значимых различий с учетом поправки Бонферрони проводилось попарное сравнение с помощью критерия Двасса–Стилера–Кричлоу–Флигнера. Корреляционная зависимость определялась с использованием ранговой корреляции Спирмена. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Чтобы оценить уровень воспалительной реакции мы решили на первом этапе оценить уровень наиболее известных хемокинов, которые принимают участие в развитии воспалительной реакции (табл. 1).

Было установлено, что содержание CXCL1 увеличивается к 7 сут экспериментального РА, а затем к 21 сут нормализуется. Другая картина наблюдается с хемокином CCL2 – в опытной группе его концентрация резко возрастает к 7 суткам и остаётся высокой на всем протяжении эксперимента.

Затем мы изучили изменения содержания белка S100 в острую (7 сутки) и хроническую (21 сутки) стадии воспаления при РА (табл. 2).

Было показано, что содержание белка S100 в суставной сумке резко возрастает с 7 сут эксперимента и в дальнейшем сохраняется на высоком уровне.

В следующей серии экспериментов мы изучили изменения в обмене аминокислоты триптофана при экспериментальном РА.

Нами установлено, что при экспериментальном РА в суставной сумке повышается содержание метаболитов триптофана по кинурениновому пути – KYN

и 3HKYN, в то же время снижается концентрация метаболитов по серотониновому пути – 5H (табл. 3).

Обсуждение

Как можно объяснить полученные результаты? Хемокины представляют собой группу цитокинов с низкой молекулярной массой, которые, в основном, управляют хемотаксисом клеток. Они играют важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Эти молекулы не только индуцируют аутоиммунные реакции в органах пациентов, но также мо-

гут усиливать индуцированные воспалительные реакции. Известно, что CXCL1 участвует в регуляции острого воспаления и закономерно, переход воспалительной реакции в хроническое состояние, приводит к его снижению [7].

CCL2 или моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) может индуцировать передвижение и привлечение моноцитов и макрофагов к месту повреждения. Когда CCL2 связывается со своими рецепторами, запускаются различные сигнальные пути, что в конечном итоге приводит к различным им-

Таблица 1/Table 1

**Концентрация хемокинов при ревматоидном артрите в хрящевой ткани в области коленных суставов крыс
Concentration of chemokines in rheumatoid arthritis in cartilage tissue in the area of the knee joints of rats**

Показатель	Интактная группа	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	1	2	3	4
CXCL1 пг/мл	19,5 (17,2; 21,3)	71,5 (62,3; 80,4)*	31,0 (27,7; 35,6)	21,9 (17,9; 23,8)
CCL2 пг/мл	50,3 (45,6; 59,2)	2860 (2361; 3256)*	3508 (3152; 3858)	2806 (2278; 3223)**

Примечание. * – $p < 0,05$ между 1 и 2 группами. ** – $p < 0,05$. между 1 и 4 группами.
Note. * – $p < 0.05$ between groups 1 and 2. ** – $p < 0.05$. between groups 1 and 4.

Таблица 2/Table 2

**Содержание белка S100 при ревматоидном артрите в хрящевой ткани в области коленных суставов крыс
Tissue S100 protein content in rheumatoid arthritis in cartilage tissue in the area of the knee joints of rats**

Показатель	Интактная группа	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	1	2	3	4
Белок S100, %	9,5 (8,00; 11,0)	28,5 (20,5; 34,0) *	28,0 (23,0; 30,0)	35,0 (31,8; 38,0) **

Примечание. * $p < 0,05$ между 1 и 2 группами ** $p < 0,05$. между 1 и 4 группами.
Note. * – $p < 0.05$ between groups 1 and 2. ** – $p < 0.05$. between groups 1 and 4.

Таблица 3/Table 3

**Концентрация метаболитов триптофана при ревматоидном артрите в хрящевой ткани в области коленных суставов крыс
Tryptophan metabolite concentration in rheumatoid in cartilage tissue in the area of the knee joints of rats**

Метаболит μmol/l	Интактная группа	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	1	2	3	4
TRP	1,09 [1,01; 1,19]	1,02 [0,82; 1,04]	1,10 [0,97; 1,14]	1,21 [1,14; 1,35]
KYN	0,034 [0,011; 0,044]	0,067 [0,0666; 0,076] *	0,074 [0,0726; 0,079]	0,0865 [0,0762; 0,0882] **
3HKYN	15,7 [15,5; 18,3]	15,9 [14,4; 17,0]	15,7 [12,3; 19,1]	18,9 [17,5; 20,3] **
5HTp	11,8 [11,3; 12,5]	3,30 [2,80; 3,89] *	3,76 [3,60; 5,72]	4,42 [4,24; 6,88] **

Примечание: * $p < 0,05$ между 1 и 2 группами. ** $p < 0,05$. между 1 и 4 группами.
Note. * – $p < 0.05$ between groups 1 and 2. ** – $p < 0.05$. between groups 1 and 4.

мунологическим изменениям, таким как воспаление. Этот хемокин также участвует в нескольких событиях, вовлеченных в патогенез РА, таких как остеокластогенез, миграция эффекторных Т-клеток в синовиальную ткань РА и ангиогенез [8]. Взаимодействие между окислительным стрессом и CCL2 является еще одним важным аспектом РА. При окислительном стрессе нарушается баланс между оксидантами и антиоксидантной системой, характеризующийся перепроизводством активных форм кислорода и активных форм азота. Эти нарушения окислительно-восстановительного баланса модулируют экспрессию воспалительных CCL2, что приводит к усилению воспаления и вызывает повреждение тканей при аутоиммунных заболеваниях [9]. Таким образом, закономерно, что его концентрация остается высокой на протяжении всего периода развития РА.

Белок S100 играет решающую роль в патогенезе РА, поскольку он запускает хемотаксис, миграцию фагоцитов и модуляцию нейтрофилов и макрофагов. Более высокие уровни белка S100 были обнаружены в синовиальной жидкости, плазме и сыворотке крови пациентов с РА. Недавние исследования продемонстрировали выраженную корреляцию между белком S100 и совокупными показателями активности воспалительной реакции при РА [10].

Начальная стадия заболевания РА связана с изменениями иммунной системы с последующей выработкой аутоантител, нацеленных на различные молекулы, включая модифицированные собственные эпитопы. На следующих стадиях заболевания как дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы, так и В- и Т-лимфоциты вносят вклад в усиление хронического воспалительного состояния. Фундаментальной аномалией при РА является неадекватный рост иммунных и стромальных клеток, что предъявляет высокие метаболические требования для выработки энергии и биосинтетических предшественников. Накапливающиеся данные свидетельствуют о важной связи между РА и метаболизмом аминокислот, в частности триптофана. TRP, редкая незаменимая аминокислота, является предшественником синтеза белка и образования нескольких молекул, участвующих в фундаментальных биологических процессах. Большая часть TRP метаболизируется по кинурениновому пути, а оставшийся превращается в серотонин и мелатонин по серотониновому пути [11, 12].

В настоящее время установлено, что кинурениновый путь является важным регулятором функции иммунной системы. При этом метаболиты TRP могут как усугублять, так и тормозить развитие РА [13].

Триптофан вступает в серотониновый путь, когда фермент триптофангидроксилаза превращает эту незаменимую аминокислоту в 5-гидрокситриптофан, который затем последовательно превращается в серотонин, мелатонин и другие метаболиты. Помимо активности в качестве нейромедиатора (серотонин) или гормона/хронобиотика (мелатонин), метаболиты TRP, вырабатываемые по серотониновому пути, обладают противовоспалительным и антиоксидантным действием посредством множества биохимических механизмов. Таким образом, снижение их концентрации приводит к усилению воспаления при РА. Возможно, угнетение серотонинового пути объясняет серьезные депрессивные расстройства, встречающиеся у пациентов с РА [14].

Нами выявлены значимые связи белка S100 с KYN ($r=0,691, p<0,05$), с 3HKYN ($r=0.354, p<0,05$) и с 5HTp ($r=-0.415, p<0,05$).

Семейство белков S100 вырабатываются различными иммунными клетками. Воспалительная инфильтрация лейкоцитами (в основном макрофагами) и провоспалительные цитокины играют важную роль в прогрессировании РА. Белок S100 повышает уровни фактора некроза опухоли (TNF- α), интерлейкина-1 β (IL-1 β) и интерлейкина-6 (IL-6). Увеличение уровня этих факторов воспаления, в свою очередь, может стимулировать нейтрофилы и макрофаги, создавая порочный воспалительный цикл [15]. Белок S100 рекрутирует клетки костного мозга из очагов воспаления в организме, ускоряя воспалительный процесс. Белок S100 также стимулирует синовиальные фибробласты и регулирует их активность [16]. Прямые положительные корреляции белка S100 с содержанием метаболитов триптофана по кинурениновому пути и отрицательные с 5HTp свидетельствуют о важной роли обмена триптофана в патологических процессах при РА. Это подтверждает и ряд исследований проведенных в последние годы [17].

Выводы

1. При экспериментальном РА изменяется содержание хемокинов: CXCL1 повышен на 7 сутки (острый период развития РА), а концентрация CCL2 остается высокой на всем протяжении эксперимента.
2. При РА наблюдается высокое содержание белка S100.
3. При экспериментальном РА повышается содержание метаболитов триптофана – KYN, 3HKYN и снижается концентрация 5HTp.
4. Имеются выраженные корреляционные связи между содержанием белка S100 и метаболитами триптофана.

Литература

(п.п. 1-11; 13; 14; 16; 17 см. References)

12. Быков Ю.В. Дисфункция мелатонинергической системы в патогенезе сахарного диабета. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 73–8. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.73-78>
15. Фефелов А.А., Баясхаланова Ц.Б., Терешков П.П., Фефелова Е.В., Цыбиков Н.Н. Морфологические и иммунологические изменения тканей при экспериментальном пародонтите у крыс. *Забайкальский медицинский вестник*. 2023; 1: 74–81. https://doi.org/10.52485/19986173_2023_1_74

References

1. Gao Y., Zhang Y., Liu X. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and therapeutic advances. *Med Comm*. 2024; 5(3): 509. <https://doi.org/10.1002/mco2.509>
2. Carnazzo V., Redi S., Basile V., Natali P., Gulli F., Equitani F. Calprotectin: two sides of the same coin. *U. Rheumatology (Oxford)*. 2024 Jan 4; 63(1): 26–33. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead405>
3. Manfredi M., Van Hoovels L., Benucci M., De Luca R., Coccia C., Bernardini P. Circulating Calprotectin (cCLP) in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2023; 22(5): 103295. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2023.103295>
4. Lu Z.F., Hsu C.Y., Younis N.K., et al. Exploring the significance of microbiota metabolites in rheumatoid arthritis: uncovering their contribution from disease development to biomarker potential. *AP-MIS*. 2024 Mar 12. <https://doi.org/10.1111/apm.13401>
5. Ogbuchi J., Clanchy F.I., Huang Y.S., Topping L.M., Stone T.W., Williams R.O.IDO activation, inflammation and musculoskeletal disease. *Exp Gerontol*. 2020 Mar; vol. 131: 110820. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110820>
6. Šteigerová M., Šíma M., Slanař O. Pathogenesis of collagen-induced arthritis: role of immune cells with associated cytokines and antibodies, comparison with rheumatoid arthritis. *Folia Biol (Praha)*. 2023; 69(2): 41–9. <https://doi.org/10.14712/fb2023069020041>
7. Ghafouri-Fard S., Shahir M., Taheri M., Salimi A. A review on the role of chemokines in the pathogenesis of systemic lupus erythemato-

tosus. *Cytokine*. 2021 Oct; 146: 155640. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155640>

8. Moadab F., Khorramdelazad H., Abbasifard M. Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sci*. 2021 Mar 15; 269: 119034. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119034>
9. Chen W., Fang Y., Wang H. et al. Role of chemokine receptor 2 in rheumatoid arthritis: A research update. *Int Immunopharmacol*. 2023 Mar; 116: 109755. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109755>
10. Zeng J., Liu X., Liu J., Wu P., Yang L. Linkage of calprotectin with inflammation, activity and treatment response of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Biomark Med*. 2022 Dec; 16(17): 1239–49. <https://doi.org/10.2217/bmm-2022-0216>
11. Mangoni A.A., Zinellu A. A systematic review and meta-analysis of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in rheumatic diseases. *Front Immunol*. 2023 Oct. 23; 14: 1257159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1257159>
12. Bykov Yu.V. Dysfunction of the melatoninergic system in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2023; 67(4): 73–8. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.73-78> (in Russian)
13. Panfil E., Gerli R., Grohmann U., Pallotta M.T. Amino Acid Metabolism in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe? *Biomolecules*. 2020 Sep; 10(9): 1280. <https://doi.org/10.3390/biom10091280>
14. Brock J., Basu N., Schlachetzki J.C.M., Schett G., McInnes I.B., Cavanagh J. Immune mechanisms of depression in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2023 Dec; 19(12): 790–804. <https://doi.org/10.1038/s41584-023-01037-w>
15. Fefelov A.A., Bayaskhalanova Ts.B., Tereshkov P.P., Fefelova E.V., Tsybikov N.N. Morphological and immunological tissue changes in experimental periodontitis in rats. *Zabaykal'skii meditsinskii vestnik*. 2023; 1: 74–81. https://doi.org/10.52485/19986173_2023_1_74 (In Russian)
16. Wu Y.Y., Li X.F., Wu S., Niu X.N., Yin S.Q., Huang C. Role of the S100 protein family in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2022 Jan 31; 24(1): 35. <https://doi.org/10.1186/s13075-022-02727-8>
17. Bartikoski B.J., De Oliveira M.S., Do Espírito Santo R.C. et al. A Review of metabolomic profiling in rheumatoid arthritis: bringing new insights in disease pathogenesis, treatment and comorbidities. *Metabolites*. 2022 Apr 27; 12(5): 394. <https://doi.org/10.3390/metabo12050394>

Сведения об авторах:

Степанов Евгений Александрович, аспирант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: eugen3-stepanov@ya.ru;

Баясхаланова Цындыма Болотовна, ассистент каф. гистологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: bayasxalanovac@rambler.ru;
Фефелова Елена Викторовна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: fefelova.elena@mail.ru;

Степанов Александр Валентинович, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: avstep@rambler.ru;

Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: trp6915@mail.ru;

Степанова Мария Олеговна, ассистент каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: mariyanovikova1996@gmail.com;

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

© Коллектив авторов, 2024

УДК 57.024

Мавренкова П.В.¹, Хлебникова Н.Н.¹, Алчинова И.Б.¹, Шойбонов Б.Б.², Порошина А.С.³, Деморжи М.С.¹, Карганов М.Ю.¹**Стресс разлуки с матерью в раннем возрасте влияет на нейроиммуноэндокринные характеристики крыс зависимым от пола и возраста образом**¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

²ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,

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

³ООО «Экзакт Лабс», 117246, Москва, Россия,

Научный проезд, д. 20, с. 2

Введение. Стресс в раннем возрасте (СРВ), часто сопровождающийся стойкими нейроиммуноэндокринными нарушениями, в дальнейшей жизни существенно повышает риск развития нервно-психических патологий, в основе которых лежит эмоциональная дисрегуляция. Расстройства, связанные с СРВ, встречаются с разной частотой у мужчин и женщин, могут проявляться специфическими для пола симптомами и иметь различные физиологические маркеры. Для моделирования симптомов стресс-индуцированных заболеваний у грызунов используют парадигму разлучения детенышей с матерью в неонатальном периоде. **Цель работы** – оценить влияние повторяющейся длительной сепарации от матери с одновременной изоляцией от сиблингов (МСИ) на состояние периферической иммунной системы и функционирование системы стресс-реакции у самцов и самок крыс подросткового (1 мес) и взрослого (2 мес и 11 мес) возраста с нарушениями поведения.

Методика. Нарушения поведения животных тестировали с помощью общепринятых методик («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», тест социального взаимодействия и др.). Уровень 27 цитокинов/хемокинов в сыворотке крови определяли методом мультиплексного анализа. Функциональную активность классического пути системы комплемента определяли в гемолитическом тесте с использованием эритроцитов человека. Уровень кортикостерона в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Развитие гиперактивного фенотипа у взрослых крыс-МСИ обоего пола сопровождалось снижением уровня лептина и массы тимуса в подростковом возрасте. Выявлена зависимая от пола динамика изменения уровней фракталкина и VEGF: содержание хемокинов было снижено у самцов в подростковом, а у самок – в молодом взрослом возрасте; только у самок старшего возраста отмечено повышение уровня хемокинов. У самок-МСИ в возрасте 2 мес формировался провоспалительный цитокиновый профиль, который сохранялся в возрасте 11 мес. Функциональная активность системы комплемента в возрасте 2 мес была снижена у самцов-МСИ и повышена у самок. Только у самцов-МСИ выявили снижение базального уровня кортикостерона в подростковом возрасте и увеличение массы надпочечников в молодом взрослом возрасте.

Заключение. Можно предположить, что в реализацию эффектов МСИ у самцов и самок крыс вовлечены различные патофизиологические механизмы.

Ключевые слова: сепарация от матери; крысы подросткового и взрослого возраста; половые различия; цитокиновый профиль; органы-маркеры стресса

Для цитирования: Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Шойбонов Б.Б., Порошина А.С., Деморжи М.С., Карганов М.Ю. Стресс разлуки с матерью в раннем возрасте влияет на нейроиммуноэндокринные характеристики крыс зависимым от пола и возраста образом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 37-53.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.37-53

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю.; сбор материала – Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Деморжи М.С.; техническая подготовка материала – Шойбонов Б.Б., Порошина А.С.; подготовка иллюстративного материала к публикации, написание текста – Мавренкова П.В.; редактирование – Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Карганов Михаил Юрьевич, e-mail: mkarganov@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № FGFU-2022-0010 «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» ФГБНУ НИИОПП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.07.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Mavrenkova P.V.¹, Khlebnikova N.N.¹, Alchinova I.B.¹, Shoibonov B.B.²,
Poroshina A.S.³, Demorzhi M.S.¹, Karganov M.Yu.¹

Stress of early maternal separation affects the neuroimmunoendocrine characteristics of rats in a sex- and age-dependent manner

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

²Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies,
8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

³Exacte Labs,
20 Nauchnyy Proezd, Bldg. 2, Moscow, 117246, Russian Federation

Background. Early-life stress (ELS) often accompanied by persistent neuro-immune-endocrine dysfunctions in later life significantly increases the risk of developing neuropsychiatric diseases with underlying emotional dysregulation. ELS-related disorders occur at different frequency in males and females, may manifest sex-specific symptoms, and have different physiological markers. The paradigm of neonatal maternal separation is used to model the symptoms of stress-induced diseases in rats. **The aim** of the study was to assess the effect of repeated, prolonged maternal separation with simultaneous isolation from siblings (MSI) on the state of the peripheral immune system and the functioning of the stress-responsive system in adolescent (1 month) and adult (2 months and 11 months) male and female rats with behavioral disorders.

Methods. Behavioral disorders were tested using standard methods (open field, elevated plus maze, social interaction test, etc.). Concentrations of 27 cytokines/chemokines were measured by a multiplex assay. The functional activity of the classical complement pathway was measured by a hemolytic test on human erythrocytes. Blood serum corticosterone was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. The development of the hyperactive phenotype in adult MSI rats of either sex was associated with decreases in the leptin concentration and thymus mass in adolescence. Concentrations of fractalkine and VEGF showed sex-dependent changes: the chemokines were reduced in males during adolescence whereas in females, in young adulthood; only older females showed increases in chemokine concentrations. MSI females at the age of 2 months had a pro-inflammatory cytokine profile that persisted through the age of 11 months. The functional activity of the complement system was decreased in two-month-old MSI males and increased in females. Only MSI males showed a decrease in basal corticosterone in adolescence and an increase in the adrenal mass in young adulthood.

Conclusion. It was assumed that different pathophysiological mechanisms are involved in the implementation of the MSI effects in male and female rats.

Keywords: maternal separation; adolescent and adult rats; sex differences; cytokine profile; stress marker organs

For citation: Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B., Shoibonov B.B., Poroshina A.S., Demorzhi M.S., Karganov M.Yu. Stress of early maternal separation affects the neuroimmunoendocrine characteristics of rats in a sex- and age-dependent manner. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 37-53. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.37-53

Author's contribution: concept and design of the study – Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu.; collection of material – Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B.; Demorzhi M.S., technical preparation of the material – Poroshina A.S., Schoibonov B.B., preparation of illustrative material for publication, writing the text – Mavrenkova P.V.; editing the text – Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Mikhail Yu. Karganov*, e-mail: mkarganov@mail.ru

Information about the authors:

Mavrenkova P.V., <https://orcid.org/0000-0001-6987-0096>

Khlebnikova N.N., <https://orcid.org/0000-0002-0245-305X>

Alchinova I.B., <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Shoibonov B.B., <https://orcid.org/0000-0001-7061-6706>

Poroshina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-0400-2201>

Demorzhi M.S., <https://orcid.org/0000-0001-7190-4304>

Karganov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>

Funding. The study was carried out as part of a state assignment on the topic: «Assessment of the body's adaptive reactions to the action of physicochemical and environmental factors» (No. FGFU-2022-0010).

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

Received 11.07.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Переживание неблагоприятных событий в детстве, часто называемое стрессом раннего возраста (СРВ), является существенным фактором риска развития нервно-психических и соматических нарушений в дальнейшей жизни [1]. Патофизиологические механизмы расстройств, связанных с СРВ, изучены далеко не полностью. Наличие в анамнезе СРВ/детской травмы связывают с периферической иммунной дисрегуляцией и формированием провоспалительного фенотипа во взрослом возрасте, причем специфические профили воспаления зависят от конкретного типа травматического события [2]. Было высказано предположение, что провоспалительные цитокины, высвобождающиеся под влиянием СРВ, вызывают системные эффекты, выходящие далеко за пределы канонического иммунного ответа, вмешиваясь, в частности, в развитие и созревание мозга [3], а также стимулируют секрецию глюкокортикоидов, оказывающих плейотропное действие на организм, в том числе, модулирующих функционирование гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА).

Моделирование на грызунах симптомов расстройств, вызванных СРВ, позволяет изучать их патогенез в контролируемых условиях и генетически однородных популяциях. Для млекопитающих стресс сепарации от матери (МС) в неонатальный период развития детенышей является существенным средовым фактором риска, способным вызвать или демаскировать психопатологический фенотип у взрослых животных [4]. Модификации МС могут приводить к специфическим нарушениям поведения крыс в подростковом и взрослом возрасте, устойчивым сдвигам в функционировании ГГА и нарушению механизмов адаптации к стрессу. Ранее мы показали, что СРВ, вызванный многократным 6-часовым отделением детенышей от матери и сиблингов в условиях комнатной температуры, приводил к формированию гиперактивного фенотипа у молодых взрослых крыс [5]. Иммунная система играет, по-видимому, существенную роль в процессах формирования поведенческих нарушений, а также стрессоустойчивости/стрессоуязвимости взрослых особей, модулируя нейроэндокринные взаимодействия, развитие и функционирование центральной нервной системы (ЦНС) [6]. В настоящее время получены доказательства взаимовлияния ЦНС и периферической иммунной системы [3]. Статус периферической иммунной системы влияет на функции нейронов головного мозга, что может приводить к изменению поведения: снижению/повышению двигательной

активности, нарушению социального взаимодействия, изменению болевой чувствительности, эмоциональной дисрегуляции [6].

Взаимовлияние иммунной системы и ГГА модулирует регуляцию стресс-ответа. Глюкокортикоиды связываются с рецепторами иммунных клеток на периферии и в головном мозге, вызывая либо про-, либо противовоспалительный эффект, в зависимости от уровня гормонов, продолжительности их действия и анализируемой структуры/органа [7]. Провоспалительные цитокины, в свою очередь, активируют ГГА, увеличивая высвобождение адренокортикотропного гормона и кортикостерона [6]. Изменение профиля циркулирующих цитокинов, индуцированное СРВ, может быть одним из патофизиологических механизмов развития стойких дисфункций ГГА и предрасположенности к нервно-психическим нарушениям.

Расстройства, связанные с нарушением регуляции гормонов стресса, встречаются с разной частотой у мужчин и женщин, могут проявляться специфическими для пола симптомами в ответ на одинаковое аверсивное воздействие и иметь различные физиологические маркеры [8]. В связи с этим включение пола в качестве биологической переменной в доклинические исследования является важным аспектом современного подхода к изучению взаимосвязи между воздействием стресса и нейроиммуноэндокринным ответом. Данные литературы о половой и возрастной специфике в активности ГГА, нейровоспалительных реакциях и сывороточном цитокиновом профиле у грызунов, подвергнутых хроническому стрессу, в том числе стрессу МС, достаточно противоречивы [9].

Целью данного исследования было изучение влияния хронического стресса сепарации от матери и однопометников в неонатальном периоде на цитокиновый профиль и функциональную активность классического пути системы комплемента, а также на массу органов-маркеров стресса и уровень кортикостерона у молодых взрослых животных обоего пола, а также у крыс подросткового и старшего возраста.

Методика

Исследование выполнено на крысах Вистар, выращенных в виварии ФБГНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», регистрация в системе «Меркурий» – RU 1487336. Беременных и кормящих самок, а в дальнейшем животных опытных и контрольных групп содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещённости и свободным доступом к воде (водопроводная вода) и пище (сбалансированный грану-

лированный корм для грызунов ООО «Лаборатор-корм», Россия, Москва). Все манипуляции с животными были одобрены Этическим комитетом НИИ общей патологии и патофизиологии (протокол № 2-22 от 12 мая 2022 г.) в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ 33215-2014, 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Дизайн исследования. После спаривания беременных самок содержали в индивидуальных пластиковых клетках (36×20×14 см) до момента родов (0-й постнатальный день, ПНД-0). На следующий день (ПНД-1) потомство перераспределяли по кормящим самкам таким образом, что каждая самка выкармливала 6-8 детенышей (равное количество самок и самцов) из разных пометов, рожденных в один и тот же день. Эти смешанные пометы были случайным образом разделены на две группы. Одну группу составили детеныши, которые подвергались процедуре ежедневной сепарации от матери и изоляции от однопометников (МСИ). В контрольную группу (КОН) вошли крысята, которые оставались с кормящей самкой. В ПНД-24 животных одного пола, вскормленных одной самкой, отсаживали от самок в новые клетки (57×37×19 см).

Часть случайно выбранных самцов (КОН, $n=11$; МСИ, $n=10$) и самок (КОН, $n=9$; МСИ, $n=10$) декапитировали в ПНД-28 (возраст 1 мес) для получения образцов тканей и биологических жидкостей. Остальных животных не беспокоили (за исключением еженедельной чистки клеток) вплоть до тестирования поведения в ПНД-56-60 (2 мес), после чего еще часть животных была декапитирована (самцы: КОН, $n=12$; МСИ, $n=16$; самки: КОН, $n=13$; МСИ, $n=13$). У оставшихся крыс поведение оценивали повторно в ПНД-308-311 (11 мес); на данном сроке наблюдения тестирование проводили в сокращенном объеме. После завершения измерений животных также декапитировали (самцы: КОН, $n=17$; МСИ, $n=8$; самки: КОН, $n=15$; МСИ, $n=6$). Оценивали массу стресс-органов, функциональную активность классического пути системы комплемента крови и измеряли содержание цитокинов/хемокинов и кортикостерона (КОРТ) в образцах сыворотки крови.

Сепарация от матери и изоляция от однопометников. Процедуру МСИ проводили, как описано ранее [9]. Вкратце, в ПНД-2-18 крысят МСИ групп подвергали ежедневной изоляции в период 10-18 ч. Каждого детеныша помещали в пластиковый контейнер (6×6×5 см), со свежей подстилкой и переносили в соседнее по-

мещение с температурой 21-23°C. Через 6-8 часов крысят возвращали в домашние клетки. Детенышей контрольной группы ежедневно брали в руки и немедленно возвращали самке.

Оценка поведения. В возрасте 1 мес поведение животных не оценивали. В возрасте 2 мес оценку локомоторного и исследовательского поведения проводили по показателям горизонтальной и вертикальной активности в тестах «автоматизированное открытое поле» (аОП) и классическое «ОП с визуальным наблюдением» (кОП). Эти тесты различаются степенью аверсивности для крыс, в частности, размером и формой открытого пространства и интенсивностью освещения. Условия кОП являются более стрессорирующими для грызунов. Тревожноподобное поведение тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Для оценки социального поведения крыс использовали тест социального взаимодействия (ТСВ) и трехкамерный социальный тест (ТСТ). Испытания проводили в дневное время с 9.00 до 17.00; клетки с контрольными и опытными животными чередовали (КОН-МСИ-КОН-МСИ и т.д.) для снижения влияния фактора суточной активности. Каждую крысу тестировали только один раз в сутки, интервал между тестами составлял не менее 24 часов. Подробное описание тестов приведено в статье [5]. В возрасте 11 мес тесты кОП и ТСТ не проводили.

Оценка состояния иммунной и стресс-реактивной систем

Получение биологических образцов. Сбор образцов сыворотки крови проводили в интервале 10.00-15.00 ч, чередуя крыс МСИ и КОН. Сразу после декапитации смешанную венозную и артериальную кровь собирали в пробирки VacPlus («Санамедикал», Россия) с активатором свертывания (SiO_2) и разделительным гелем и центрифугировали 15 мин при 2000 g. Образцы сыворотки крови хранили при температуре -80°C до проведения биохимических исследований. Определяли массу органов-маркеров стресса – селезенки, надпочечников и тимуса. Надпочечники помещали в формальдегид для дальнейшего гистологического исследования.

Мультиплексный анализ цитокинов. Эта часть исследований выполнена на базе ФГБУ «ГНЦ-Институт иммунологии» ФМБА России. Для количественной оценки содержания цитокинов/хемокинов/факторов роста в сыворотке крови крыс использовали набор MILLIPLEX map Kit («Millipore-Merck», Дармштадт, Германия), предназначенный для одновременного определения 27 аналитов: интерлейкинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β ,

ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12(p70), ИЛ-13, ИЛ-17A, ИЛ-18; ИФН γ ; ФНО α ; гранулоцитарных колониестимулирующих факторов (granulocyte colony-stimulating factor) G-CSF, GM-CSF; эпидермального фактора роста (epidermal growth factor) EGF; эотаксина, фракталкина, лептина, моноцитарного хемотаксического белка (monocyte chemoattractant protein) MCP-1; индуцируемого ИФН- γ белка IP-10; липополисахарид-индуцируемого хемокина (lipopolysaccharide-induced chemokine) LIX; воспалительных белков макрофагов (macrophage inflammatory proteins) MIP-1 α , MIP-2; васкулярного эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor) VEGF; RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted); GRO/KC/CINC-1. Определение проводили по протоколу производителя. Образцы сыворотки крови разводили средой в два раза, чтобы максимизировать чувствительность к исходным уровням цитокинов. Тестируемый образец объемом 25 мкл инкубировали с магнитными сферами, покрытыми антителами, в течение 30 мин. После захвата аналита сферой добавляли детектирующее антитело с биотином. Затем реакционную смесь инкубировали с конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин в течение 10 мин для завершения реакции на поверхности каждой микросферы. В наборе используются 2 флуорохрома, что позволяет получать разные спектральные характеристики для идентификации и количественного определения аналита. Интенсивность флуоресценции детектирующих антител и стрептавидин-ПЭ оценивали с помощью анализатора MAGPIX (Luminex Corporation, Остин, Техас, США) и его программного обеспечения.

Большая часть образцов цитокинов была измерена, за исключением нескольких аналитов, для которых значительное (60% и более) число проб показало результаты ниже чувствительности метода: GM-CSF на всех сроках тестирования, ИЛ-13 в возрасте 1 мес, ИЛ-4 в возрасте 1 и 2 мес, ИЛ-1 α в возрасте 1 и 11 мес, ИЛ-6 и MIP-2 в возрасте 11 мес. Эти цитокины были исключены из дальнейшего анализа.

Оценка функциональной активности системы комплемента. Определение функциональной активности классического пути системы комплемента крысы проводили с использованием реакции лизиса эритроцитов человека группы А системы АВ0. Реакцию комплемент-зависимого лизиса оценивали турбидиметрически по снижению оптической плотности суспензии эритроцитов при длине волны 620 нм [10]. Степень лизиса эритроцитов в экспериментальных образцах определяли по калибровочному графику, где контроль представлял собой 0% лизиса, а полный лизис – 100%.

Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови. Содержание КОРТ в образцах сыворотки крови определяли методом ИФА с использованием набора EIA-14F1 (IDS, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя. Абсорбцию измеряли на микропланшетном фотометре Immunochem-2100 (High Technology, Inc., США) при 450 нм (длина волны сравнения 650 нм). Для экстраполяции данных была построена 4-параметровая логическая кривая с использованием ресурса Myassays.com. Реальную концентрацию КОРТ рассчитывали с учетом коэффициента разведения.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 8 (TIBCO Software Inc., США). Первоначально данные проверяли на нормальность распределения и однородность дисперсий. Если гипотезу о нормальности распределения данных принимали, то для сравнения средних значений нескольких независимых выборок применяли двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с учетом факторов «пол» (самки/самцы) и «группа» (МСИ/КОН). Данные анализировали отдельно для каждого изучаемого параметра. Апостериорное сравнение средних значений дисперсионного комплекса проводили по критерию Ньюмана–Кеулса (Newman-Keuls test). Данные представлены как $M \pm s.e.m.$ Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым. При отвержении гипотезы о нормальном распределении данных использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни для независимых переменных. Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение p ($p_{кр}$) для каждого сравнения по методу FDR-контроля. В этом случае данные представлены как $Me [Q1, Q3]$.

Результаты

Поведение животных

Результаты анализа паттернов поведения двухмесячных крыс-МСИ и крыс, выращенных с матерью, подробно описаны ранее [5] и в данной работе приведены в обобщенной форме (табл. 1). В возрасте 2 мес крысы-МСИ обоего пола демонстрировали повышенную локомоторную и исследовательскую активность, сниженную тревожность и повышенную агрессивность по сравнению с КОН. В ТСТ у самцов-МСИ наблюдали сниженное по сравнению с КОН предпочтение конспецифика несоциальному объекту (социальное предпочтение) и повышенное предпочтение незнакомой крысы (социальная новизна); самки-МСИ

не отличались от КОН по социальному предпочтению, и в меньшей степени, чем КОН, интересовались новым социальным объектом.

В возрасте 11 мес в тесте аОП выявлено влияние фактора «пол» на суммарную локомоторную активность [F(1, 42)=15.72, p=0.0003], влияние фактора «группа» не достигало уровня статистической значимости [F(1, 42)=3.20, p=0.08]. В динамике наблюдения горизонтальная двигательная активность в группе МСИ превышала таковую у контрольных животных только в отдельных точках (рис. 1, А, Б). В обеих группах локомоторная активность у самок была выше, чем у самцов той же группы. Исследовательская активность у крыс-МСИ и КОН статистически значимо не различалась [F(1, 42)=0.24, p=0.62]. В группе КОН число стоек у самок было больше, чем у самцов [F(1, 42)=6.39, p=0.01] (рис. 1, В).

В тесте ПКЛ выявлено влияние только фактора «пол» на исследовательскую активность: число [F(1, 42) = 7.79, p=0.007] и продолжительность [F(1, 42) = 6.62, p=0.013] стоек у самок были больше, чем у самцов (соответственно 10.2 ± 1.0 vs 6.6 ± 0.7; 27.1 ± 3.2 с vs 17.0 ± 2.5 с). На величину общего пробега влиял фактор «пол» [F(1, 42)= 10.08, p=0.003], выявлено взаимодействие факторов «пол×группа» [F(1, 42)= 8.22, p=0.006], однако при апостериорном сравнении (Newman-Keuls test) статистически значимые различия между группами не были обнаружены (рис. 2, А). На предпочтение ОР влиял как фактор «пол» [F(1, 42)= 14.56, p=0.0004], так и фактор «группа» [F(1, 42)= 4.12, p=0.048]. Самки-МСИ чаще заходили в открытые рукава (ОР) (данные не приведены) и больше времени проводили в ОР по сравнению с самками-КОН и с самцами-МСИ (рис. 2, Б). Самки-МСИ

демонстрировали большее число и продолжительность свешиваний в ОР по сравнению с другими группами (рис. 2, В, Г), тогда как у самцов-МСИ наблюдали больше реакций груминга, превышающих по продолжительности величину этого показателя у самцов-КОН и самок-МСИ (рис. 2, Д, Е).

В ТСВ у самцов-МСИ наблюдали большее число (6.0 [2.0;13.0]) и продолжительность (30.5 [15.5; 45.0] с) агрессивных контактов по сравнению с самцами-КОН (0.0 [0.0; 3.5] и 0.0 [0.0; 4.0] соответственно), однако различия не достигали уровня статистической значимости и сохранялись только в тенденции (p=0.07 и p=0.05 для числа и продолжительности агрессивных контактов соответственно, Mann-Whitney U Test). Самки-МСИ не отличались от КОН, а самки в целом не отличались от самцов соответствующих групп по показателям ТСВ.

Оценка состояния иммунной и стресс-реактивной систем

Содержание цитокинов/хемокинов в сыворотке крови крыс. В возрасте 1 мес уровень лептина был снижен у крыс-МСИ обоего пола по сравнению с соответствующим КОН, а уровни VEGF и фракталкина – только у самцов-МСИ; у самцов-МСИ отмечен повышенный по сравнению с КОН уровень ИЛ-5 (табл. 2). Анализ профиля цитокинов показал, что содержание ряда цитокинов у самок было выше, чем у самцов: ИЛ-2, ИФН-γ, ИЛ-18, IP-10, эотаксин, ИЛ-5, MIP-1alfa, MCP-1 в группе КОН (рис. 3, А, Б); MIP1-alfa, ИЛ-18, VEGF, фракталкин – в группе МСИ (рис. 3, В, Г).

В возрасте 2 мес при межгрупповом сравнении выявлено, что у самок-МСИ было увеличено содержа-

Таблица 1/Table 1

Направленность изменений паттернов поведения у крыс, выращенных в условиях сепарации от матери, по сравнению с крысами, выращенными с матерью, в возрасте 2 месяцев

The direction of changes in behavior patterns in rats raised in conditions of maternal separation, compared with rats raised with the mother, at the age of 2 months

Тесты	аОП		ПКЛ	ТСВ		ТСТ	
	Локомоторная активность	Исследовательская активность	Уровень тревожности	Социальность	Агрессивность	Социальное предпочтение	Социальная новизна
Самцы	↑↑	↑	↓	=	↑↑	↓	↑
Самки	↑↑	↑	↓	=	↑	=	↓

Примечание. ↑ увеличение эффекта; ↓ уменьшение эффекта; = не отличается от контрольных значений; аОП – автоматизированное открытое поле, ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ТСВ – тест социального взаимодействия; ТСТ – трехкамерный социальный тест.
Note. ↑ increase in effect; ↓ decrease in effect; = does not differ from the control values; аОП – an automated open field, ECM – an elevated cruciform maze; TSI – a test of social interaction; TST – a three-chamber social test.

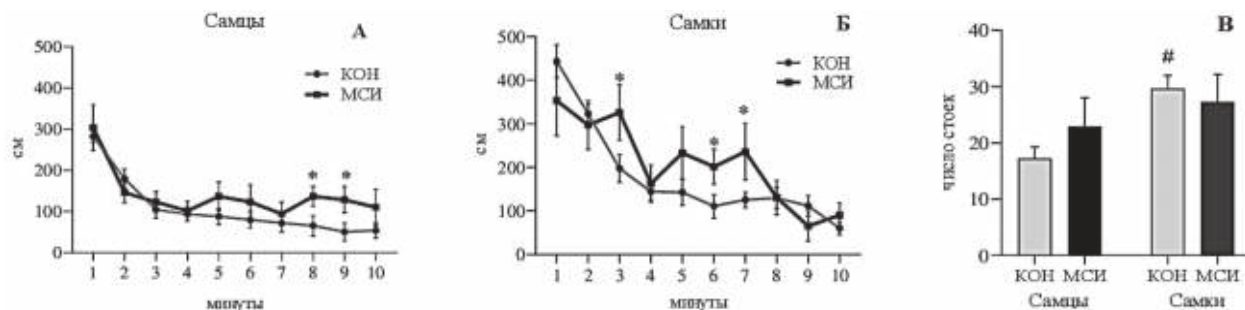


Рис. 1. Локомоторная активность самцов (А) и самок (Б) крыс, подвергнутых неонатальной сепарации от матери (МСИ, квадратики), и крыс, выращенных с матерью (КОН, кружки), и суммарная (за 10 мин) исследовательская активность крыс (В) в возрасте 11 мес. * $p < 0.05$ по сравнению с КОН, # $p < 0.05$ по сравнению с самцами соответствующей группы (Newman-Keuls test).

Fig. 1. Locomotor activity of male (А) and female (Б) rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI, squares) and rats raised with their mother (CON, circles), and the total (in 10 min) exploratory activity of rats (С) at the age of 11 months. * $p < 0.05$ compared to CON, # $p < 0.05$ compared to males of the corresponding group (Newman-Keuls test).

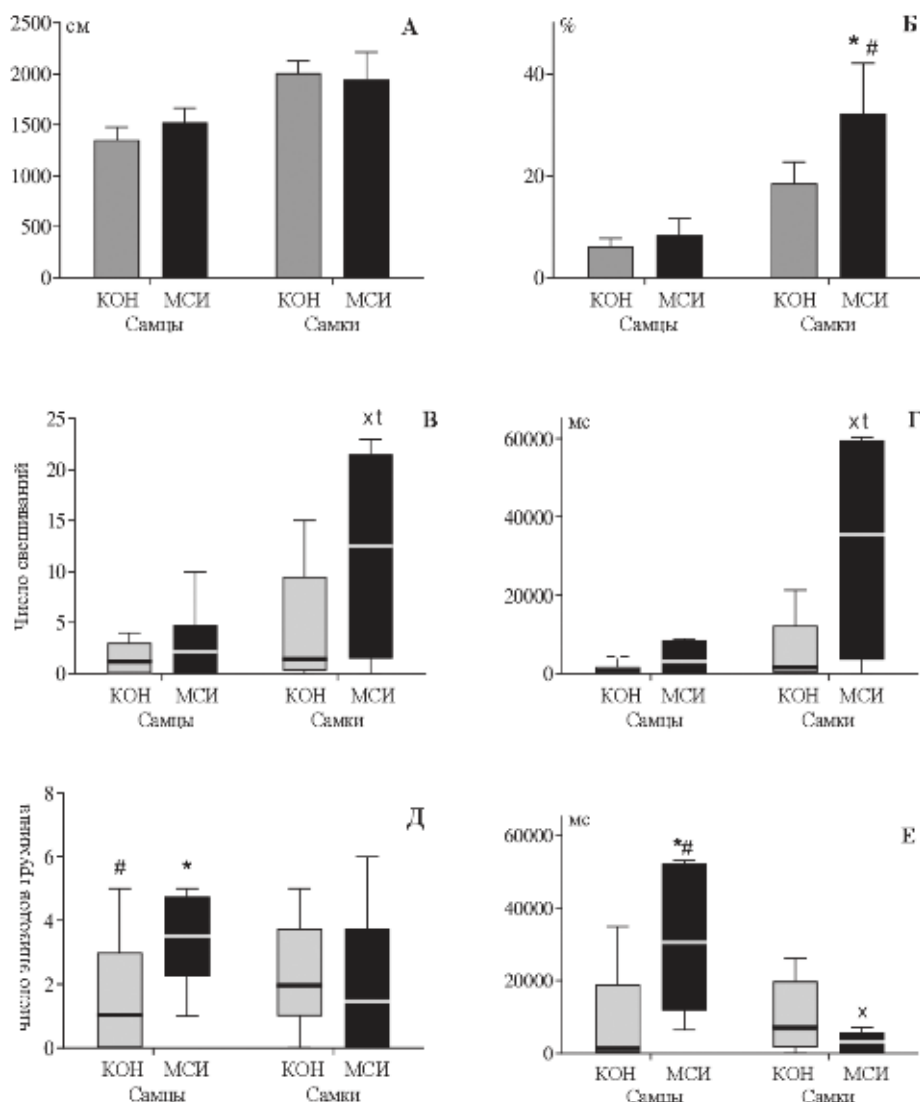


Рис. 2. Показатели поведения в приподнятом крестообразном лабиринте самцов и самок крыс в возрасте 11 мес, подвергнутых в неонатальный период сепарации от матери (МСИ), по сравнению с контрольными крысами (КОН), выращенными с матерью. А) общий пробег; Б) предпочтение открытых рукавов (по длительности пребывания в отсеке); В) и Г) число и длительность свешивания из открытых рукавов; Д) и Е) число и длительность груминга. Для А и Б результаты представлены в виде $M \pm s.e.m.$, Newman-Keuls test; для В – Е – Медиана [Q1; Q3]; Mann-Whitney U Test, * $p < p_{кр}$; # $p < p_{кр}$ по сравнению с КОН, * $p < p_{ср}$; # $p < p_{ср}$ по сравнению с животными другого пола.

Fig. 2. Characteristics of behavior in the elevated plus maze of male and female rats at the age of 11 months, exposed to the neonatal maternal separation (MSI), compared with the control rats (CON) raised with their mother. А) total distance; Б) preference of open arms (for the duration of stay in the compartment); С) and Д) the number and duration of hanging from the open arms; Е) and F) the number and duration of grooming. For А and В, the results are presented as $M \pm s.e.m.$, Newman-Keuls test; for С – Е – Median [Q1; Q3]; Mann-Whitney U Test, * $p < p_{cr}$; # $p < p_{cr}$ compared to CON, * $p < p_{gr}$; # $p < p_{gr}$ compared to animals of the other sex.

ние ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-12-Р70 и LIX, а содержание IP-10, ИЛ-10 и фракталкина было снижено по сравнению с самками-КОН (табл. 2). У самцов-МСИ были повышены уровни IP-10 и LIX. У самок по сравнению с самцами в группе КОН содержание ИЛ-5 было снижено, а содержание IP-10 повышено; в группе МСИ были снижены уровни ИЛ-1β, ИЛ-10, фракталкина и IP-10.

В возрасте 11 мес у самок-МСИ по сравнению с КОН уровень IP-10 был повышен, а уровни MIP1-alfa, ИЛ1-beta, ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-18, VEGF и фракталкина были снижены (табл. 2). У самцов различия в уровнях цитокинов не были выявлены. Отличия в содержании цитокинов у самок и самцов в группе КОН отмечены только на уровне тенденции (рис. 3, И, К),

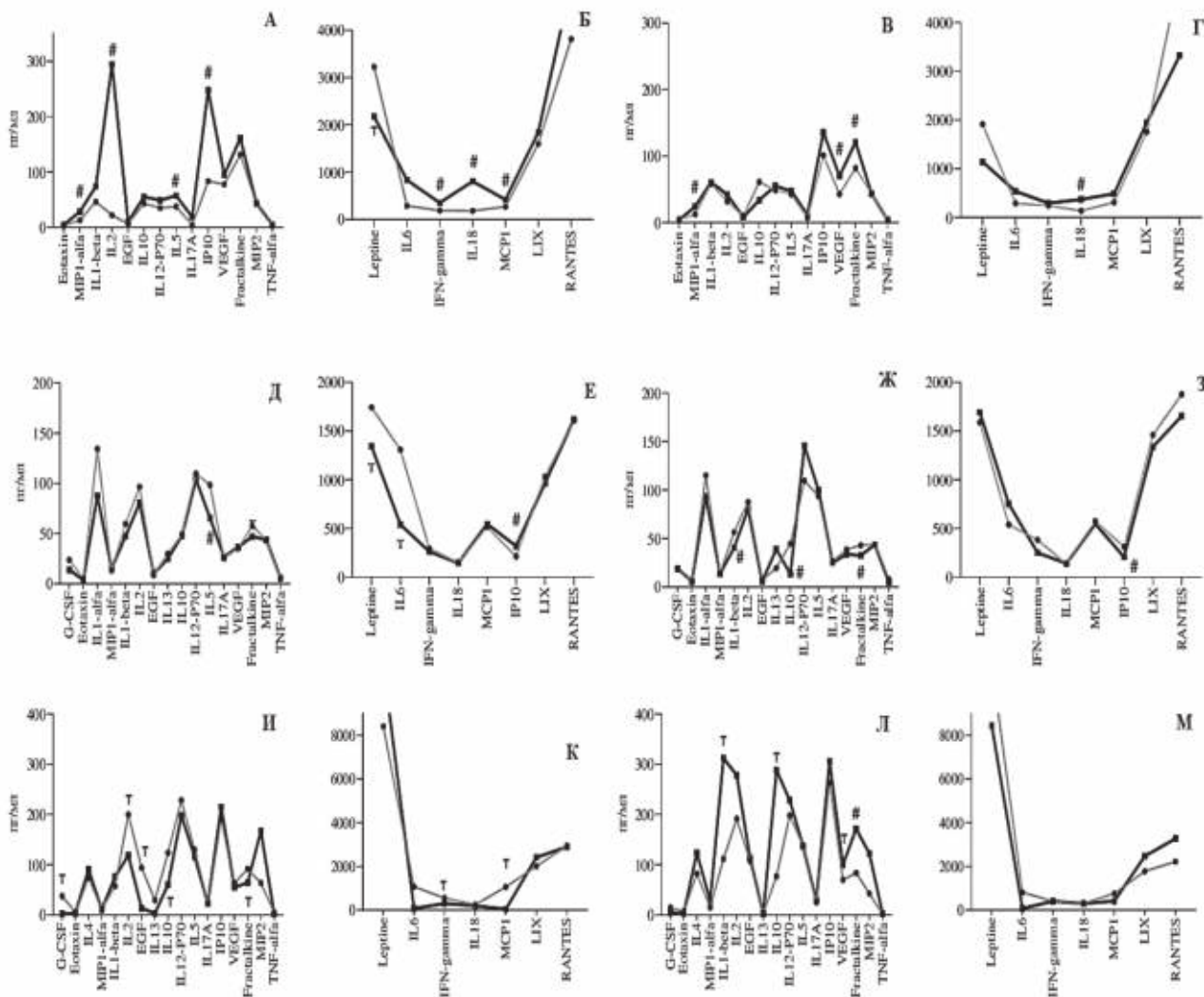


Рис. 3. Цитокиновый профиль самцов (серая линия, кружки) и самок (черная линия, квадратики) крыс, выращенных с матерью (КОН, А, Б, Д, Е, И, К), и крыс, подвергнутых стрессу сепарации от матери (МСИ, В, Г, Ж, З, Л, М). А-Г – в возрасте 1 мес, Д-З – в возрасте 2 мес, И-М – в возрасте 11 мес # $p < p_{кр}$; $p_{кр} < #p < 0.05$; $T < 0.1$ по сравнению с самцами соответствующей группы (Mann–Whitney U Test). Межквартильные разбросы не приведены для облегчения восприятия рисунков.

Fig. 3. Cytokine profiles of males (gray line, circles) and females (black line, squares) of rats raised with their mother (CON, A, B, D, E, I, K), and rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI, C, D, W, Z, L, M). A-G – at the age of 1 month, D-Z – at the age of 2 months, I-M – at the age of 11 months. # $p < p_{cr}$; $p_{cr} < #p < 0.05$; $T < 0.1$ compared to males of the corresponding group (Mann–Whitney U Test). The interquartile ranges are not given to facilitate the perception of the figures.

Таблица 2/Table 2

Содержание некоторых цитокинов/хемокинов в сыворотке крови самцов и самок крыс подросткового и взрослого возраста, подвергнутых в неонатальном периоде сепарации от матери (МСИ) или выращенных с матерью (КОН)

The content of certain cytokines/chemokines in the blood serum of male and female adolescent and adult rats subjected to neonatal maternal separation (MSI) or raised with their mother (CON)

	Самцы		Самки	
	КОН	МСИ	КОН	МСИ
1 месяц				
VEGF	80.3 [46.3; 129.6]	42.8* [31.7; 82.1]	95.0 [49.1; 1073.5]	70.2 # [33.6; 1514.9]
Фракталкин	134.2 [74.2; 287.9]	82.1* [49.5; 202.3]	161.3 [67.8; 2630.6]	121.1 # [59.6; 2834.6]
Лептин	3491.9 [1875.1; 6664.1]	1916.4* [297.8; 3727.3]	2178.3(#) [1786.9; 4341.6]	1141.8* [206.4; 3159.1]
ИЛ-5	37.6 [24.9; 48.1]	47.8^x [24.9; 69.3]	57.2 [3.2; 17.4]	47.4 [14.0; 73.2;]
2 месяца				
IP-10	213.1 [112.8; 350.7]	311.6* [177.1; 596.7]	291.2 # [181.0; 562.1]	207.1*# [164.7; 321.4]
ИЛ-6	1307.6 [293.0; 5822.9]	539.6 [293.0; 1475.4]	539.6 [140.6; 1132.8]	753.3^x [293.0; 1307.6]
ИЛ-10	49.2 [13.3; 151.8]	44.7 [22.2; 124.6]	74.0 [13.3; 488.8]	13.3*# [8.8; 55.2]
ИЛ-12-P70	109.7 [74.3; 283.7]	109.6 [61.9; 195.3]	101.1 [41.9; 153.6]	145.6^x [74.3; 174.7]
ИЛ-5	98.4 [73.2; 184.0]	93.7 [557.2; 1148.2]	65.5 [24.9; 106.0]	100.0^x [73.2; 117.4]
VEGF	35.2 [26.7; 60.0]	38.7 [29.6; 43.5]	38.0 [29.6; 47.7]	31.7 ^T [26.7; 36.4]
Фракталкин	57.5 [29.3; 128.9]	43.1 [23.6; 1595.3]	49.5 [26.4; 89.1]	32.6^x [17.7; 48.7]
LIX	1029.0 [612.8; 1512.9]	1459.7 ^x [723.5; 2233.4]	963.1 [509.7; 2107.7]	1406.4^x [976.5; 1705.8]
Лептин	1842.0 [898.9; 3923.7]	1587.1 [1116.9; 2967.1]	1343.1 (#) [594.9; 2531.1]	1689.1 [1257.6; 2221.0]
11 месяцев				
IP 10	215.1 [40.5; 308.3]	190.5 [131.8; 365.4]	305.9 # [277.3; 592.9]	263.1* # [64.5; 582.3]
MIP-1α	12.2 [4.5; 21.4]	14.7 [8.3; 45.7]	10.5 [5.5; 19.9]	27.4*^T [10.1; 96.7]
ИЛ-1β	57.3 [19.7; 199.7]	111.5 [17.8; 240.3]	75.9 [34.6; 178.5]	312.1*^T [74.2; 647.3]
ИЛ-2	199.7 [33.3; 306.0]	191.5 [4.8; 319.4]	119.0 [3.4; 241.9]	278.3^x [99.4; 1740.4]
ИЛ-10	123.4 [34.0; 202.2]	76.9 [34.0; 835.2]	60.4 [14.3; 152.8]	288.2*# [123.4; 699.4]
VEGF	63.4 [23.4; 108.9]	69.7 [35.7; 145.9]	54.7 [23.4; 93.4]	99.9* [66.2; 378.9]
Фракталкин	91.7 [24.7; 152.0]	83.3 [55.9; 205.0]	64.2 [10.7; 107.9]	171.4* [116.5; 726.7]
ИЛ-18	247.0 [56.2; 411.3]	294.9 [127.1; 664.9]	189.2 [110.5; 354.2]	294.8 ^x [204.1; 2041.1]

Примечание. * $p < p_{гр.}, p_{гр} < x p < 0.05$ и $T p = 0.1$ по сравнению с КОН, # $p < p_{гр.}; (#) p < 0.08$ по сравнению с самцами той же группы.

Note. * $p < p_{gr.}, p_{gr} < x p < 0.05$ and $T p = 0.1$ compared to CON, # $p < p_{gr.}; (#) p < 0.08$ compared to males of the same group.

в группе МСИ у самок статистически значимо был повышен уровень фракталкина (рис. 3, К, М).

Функциональная активность классического пути системы комплемента в сыворотке крови крыс. В возрасте 1 мес все животные показали низкую функциональную активность системы комплемента в отношении эритроцитов человека (рис. 4, А). Внутригрупповых и межгрупповых различий не обнаружено.

В возрасте 2 мес выявлено взаимодействие факторов «пол × группа» [F(1, 51)=9.68, p=0.003]: у самцов-МСИ лизис эритроцитов был ниже, а у самок выше, чем у соответствующих контрольных животных (рис. 4, Б).

В возрасте 11 мес животные обоего пола демонстрировали высокую функциональную активность системы комплемента, однако статистически значимых отличий между группами по этому показателю не обнаружено (рис. 4, В).

Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс. В возрасте 1 мес выявлено влияние фактора «пол» [F(1, 35)=5.08, p=0.03] и взаимодействие факторов «пол × группа» [F(1, 35)=4.95, p=0.03] на базовый уровень КОРТ в сыворотке крови. У самок-КОН уровень КОРТ был выше, чем у самцов, в группе МСИ половых различий в содержании КОРТ не выявлено (рис. 5, А). При межгруппо-

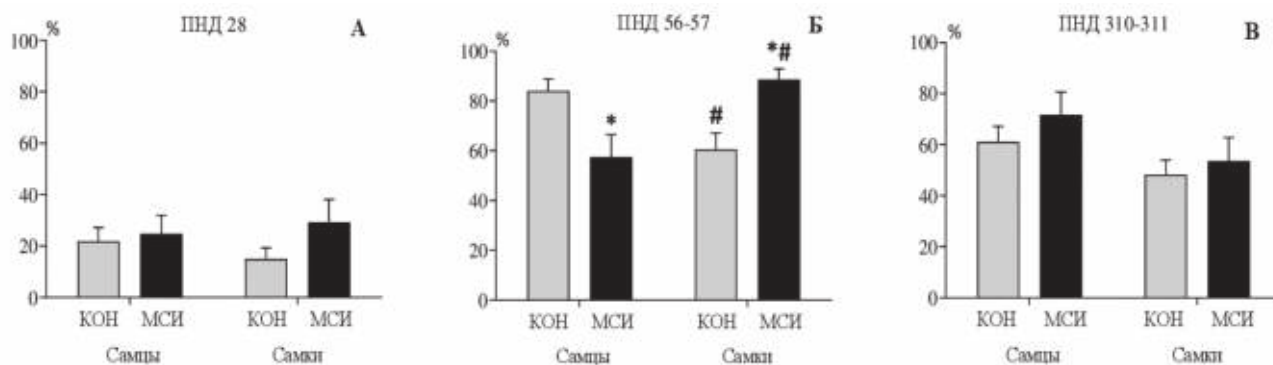


Рис. 4. Функциональная активность системы комплемента самцов и самок крыс, подвергнутых в неонатальном периоде сепарации от матери (МСИ) или выращенных с матерью (КОН), в возрасте 1 мес (А), 2 мес (Б) и 11 мес (В). *p<0.05 по сравнению с КОН. #p<0.05 по сравнению с самцами той же группы (Newman-Keuls test)

Fig. 4. Functional activity of the classical pathway of the complement system of male and female rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI) or raised with their mother (CON), at the age of 1 month (A), 2 months (B) and 11 months (C). *p<0.05 compared to CON. #p<0.05 compared to males of the same group (Newman-Keuls test).

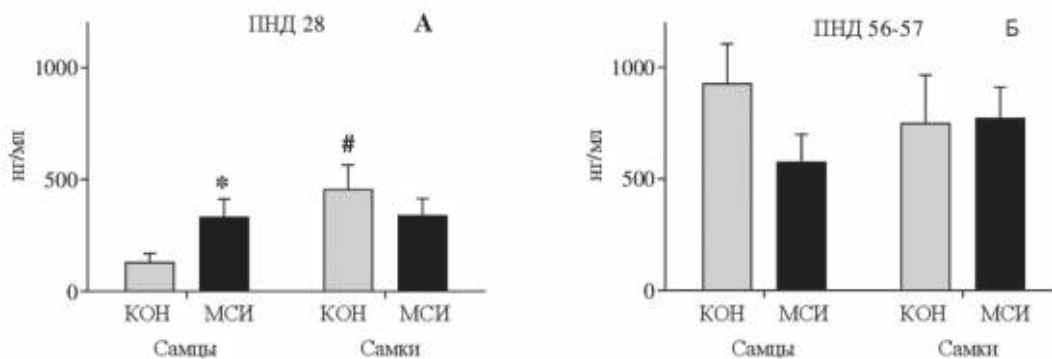


Рис. 5. Содержание кортикостерона в сыворотке крови самцов и самок крыс в возрасте 1 мес (А) и 2 мес (Б). МСИ – крысы, подвергнутые неонатальной сепарации от матери и однопометников, КОН – крысы, выращенные с матерью. *p=0.047 по сравнению с КОН. #p=0.016 по сравнению с самцами соответствующей группы (Newman-Keuls test).

Fig. 5. The corticosterone content in the blood serum of male and female rats aged 1 month (A) and 2 months (B). MSI – the rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI), CON – rats raised with their mother. *p=0.047 compared to CON. #p=0.016 compared to males of the corresponding group (Newman-Keuls test).

вом сравнении у самцов-МСИ обнаружен повышенный уровень КОРТ по сравнению с самцами-КОН.

В возрасте 2 мес не выявлено статистически значимых различий в содержании КОРТ при межгрупповом и внутригрупповом сравнении (рис. 5, Б). В возрасте 11 мес уровень КОРТ не оценивали.

Вес органов-маркеров стресса. В возрасте 1 мес выявлено влияние фактора «пол» на абсолютный $[F(1, 35)=5.05, p=0.03]$ и относительный $[F(1, 35)=5.53, p=0.02]$ вес селезенки и фактора «группа» – на абсолютный $[F(1, 35)=14.73, p=0.0005]$ и относительный $[F(1, 35)=19.7, p<0.0003]$ вес тимуса. В группе МСИ вес тимуса был меньше, чем в группе КОН: у самцов – статистически значимо, у самок $p=0.08$ (рис. 6). Относительный вес селезенки у самок-КОН был самым большим и превышал значение показателя у самцов-КОН и самок-МСИ (рис. 6). На остальные показатели оцениваемые факторы не влияли. Взаимодействия факторов также не обнаружено.

В возрасте 2 мес выявлено влияние фактора «пол» на абсолютный $[F(1, 51)=37.99, p<0.0001]$ и относительный $[F(1, 51)=77.65, p<0.0001]$ вес надпочечников и относительный вес тимуса $[F(1, 51)=4.68, p=0.03]$. Фактор «группа» влиял на относительный вес тимуса $[F(1, 51)=6.97, p=0.01]$ и селезенки $[F(1, 51)=5.09, p=0.03]$. Взаимодействие факторов «пол × группа» обнаружено для относительного веса надпочечников $[F(1, 51)=4.66, p=0.03]$, абсолютного $[F(1, 51)=5.18, p=0.03]$ и относительного $[F(1, 51)=6.19, p=0.02]$ веса селезенки. В группе МСИ по сравнению с КОН у самцов был больше относительный вес надпочечников и селезенки, у самок – относительный вес тимуса (рис. 6).

В возрасте 11 мес фактор «пол» влиял на вес тела животных и абсолютный и относительный вес всех стресс-органов [во всех случаях $F(1, 42) \geq 11.41, p \leq 0.002$], а фактор «группа» – на абсолютный $[F(1, 42)=12.13, p=0.001]$ и относительный $[F(1, 42)=7.39, p=0.009]$ вес тимуса.

Обсуждение

Поведение животных. В нашем исследовании многократное отлучение новорожденных крысят от матери в критический период развития мозга и созревания ГГА приводило к формированию у молодых взрослых животных гиперактивного фенотипа, характеризующегося высокой локомоторной и исследовательской активностью и сниженным уровнем тревожности. Эти признаки сохранялись в возрасте 11 мес (хотя были менее выражены) и проявлялись преимущественно у самок. Самцы-МСИ демонстрировали признаки эмоционального напряжения в тесте ПКЛ. Возможные

биохимические механизмы этих нарушений подробно обсуждались ранее [5].

Клинические наблюдения и экспериментальные исследования показывают, что эффекты СРВ зависят от возраста тестируемых субъектов, однако данные, включая результаты мета-анализов, противоречивы [11]. Отметим, что изучение отдаленных последствий МС у животных чаще всего ограничиваются подростковым и молодым взрослым возрастом. В данной работе мы не оценивали влияние МСИ на поведение крыс в возрасте 1 мес, что накладывает определенные ограничения на интерпретацию полученных данных о связи возрастной динамики содержания цитокинов с психо-эмоциональным состоянием животных. Работ по оценке эффектов МС у крыс среднего и старшего возраста очень мало [12]. В целом, наши данные о меньшей выраженности гиперактивного фенотипа у крыс старшей возрастной группы согласуются с результатами других авторов, хотя нам не удалось найти работы, выполненные в парадигме МС на пожилых самках.

Фактор пола оказывает существенное влияние на эффекты МС, однако результаты отличаются в разных исследованиях, а механизмы, лежащие в основе влияния пола на отдаленные последствия МС, не выяснены до конца [13]. Более того, даже при наличии сходных поведенческих проявлений у взрослых животных, подвергнутых МС, механизмы, ответственные за эти паттерны, могут быть разными у самцов и самок [14].

Физиологические маркеры стресса. В нашей работе МСИ приводила к зависимым от пола и возраста изменениям маркеров стресса (уровня КОРТ и веса надпочечников, тимуса и селезенки) у крыс. Только у самцов-МСИ и только в подростковом возрасте был повышен базальный уровень КОРТ в сыворотке крови. Как у самцов, так и у самок-МСИ подросткового возраста был снижен вес тимуса; у самок, кроме того, был снижен вес селезенки. У молодых взрослых самцов-МСИ отмечена гипертрофия надпочечников и селезенки, у самок-МСИ был увеличен вес тимуса. В зрелом возрасте у самцов-МСИ был снижен вес тимуса, а у самок – вес надпочечников.

Зависимые от пола различия в содержании КОРТ в крови у крыс-подростков наблюдали после длительной (6 ч, ПНД 1-21) МС: базальные уровни гормона были повышены у самцов, но не у самок [15]. С учетом того факта, что ГГА у крыс-подростков развита не полностью [16], высказана гипотеза об активации ГГА тестостероном у самцов в подростковый период. У взрослых животных в подавляющем большинстве исследований не обнаружено влияния МС на исход-

ный уровень КОРТ, но существенно меняется реактивность ГГА [17].

Классическими (по Г. Селье) признаками хронического стресса у крыс считают гипертрофию надпочечников и тимолимфатическую атрофию (уменьшение веса тимуса, лимфатических узлов и селезенки), причем увеличение веса надпочечников и снижение веса тимуса, по-видимому, отражают тяжесть любого стресса, а изменение веса селезенки зависит от типа стресс-воздействия [18]. В доступной литературе нам не удалось найти работы по влиянию МС на вес органов-маркеров стресса, поэтому мы не можем напрямую сопоставить полученные результаты с данными других авторов. Однако снижение веса тимуса у крыс-МСИ

обою пола в подростковом возрасте свидетельствует о вовлеченности иммунной системы в формирование уязвимости/устойчивости к СРВ.

Уровни периферических цитокинов. В настоящем исследовании установлено, что МСИ вызывает у крыс зависящие от пола и возраста изменения периферических уровней ряда про- и противовоспалительных цитокинов/хемокинов (табл. 3).

Мы показали, что у крыс-МСИ обою пола в возрасте 1 мес наряду с уменьшением веса тимуса был снижен уровень адипокина лептина. Известно, что лептин выступает не только в качестве адипостатического гормона, но и в качестве цитокина – модулятора активности иммунной системы; нарушение его функ-

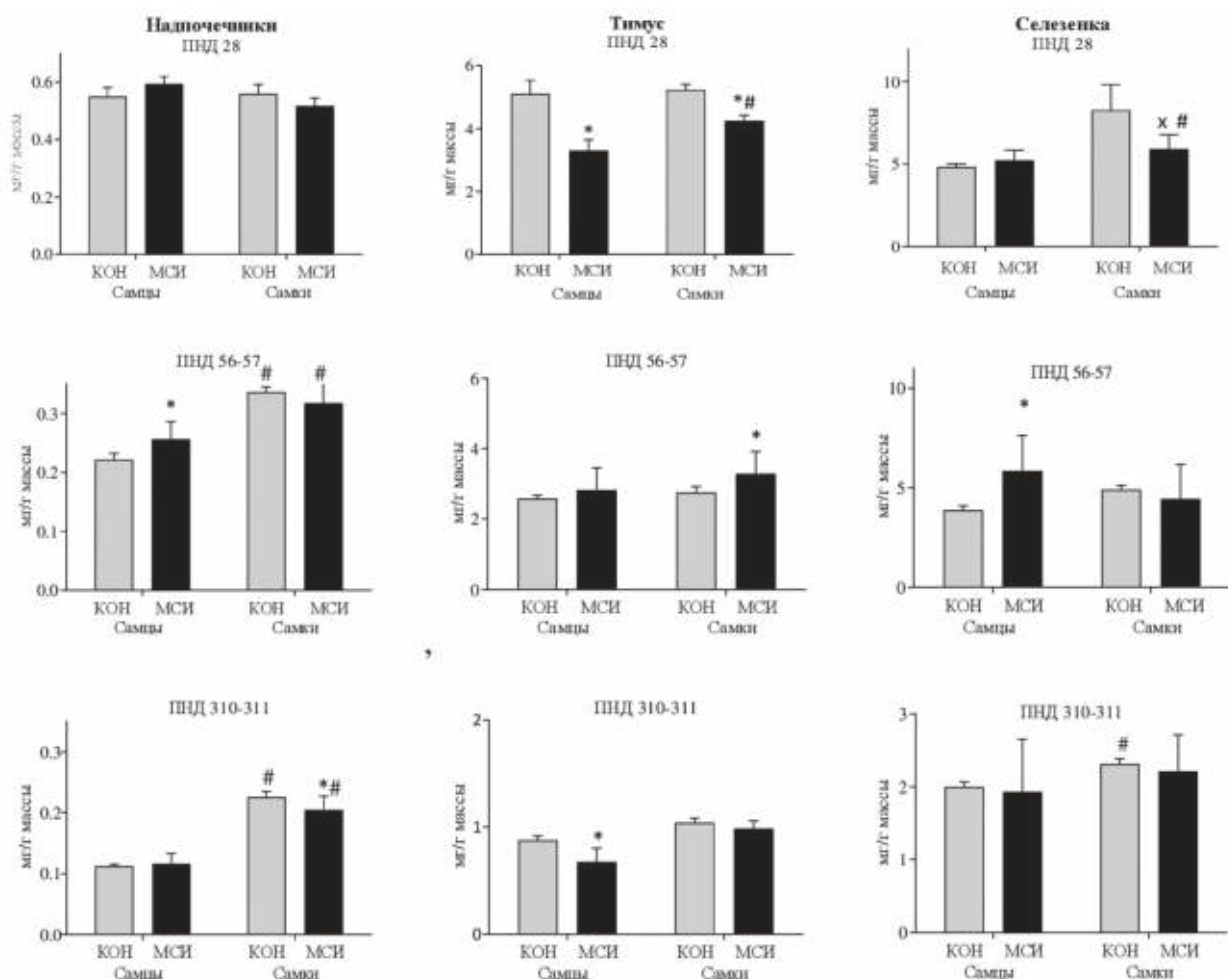


Рис. 6. Относительный вес органов-маркеров стресса. МСИ – крысы, подвергнутые неонатальной сепарации от матери и однопометников, КОН – крысы, выращенные с матерью. $p < 0.05$ по сравнению: * с соответствующим контролем, # с самцами той же группы (Newman-Keuls test).

Fig. 6. Relative weight of organs - the markers of stress. MSI – the rats exposed to the neonatal maternal separation; CON – the animals raised with their mother. $p < 0.05$ compared to: * the appropriate control, # males of the same group (Newman-Keuls test).

ции приводит к иммунодефициту, включающему аномальную активность и атрофию тимуса [19]. У крысят в период новорожденности лептин уменьшает секрецию глюкокортикоидов надпочечниками, гипореактивность ГГА обуславливает притупленную реакцию на стресс в ПНД-2-14 [20]. МС сопровождается быстрым снижением содержания лептина в плазме, что может быть одним из механизмов модуляции формирования ГГА и развития уязвимости к стрессу в более позднем возрасте.

В нашем исследовании уровни лептина были снижены у крыс обоего пола в подростковом возрасте, но не у взрослых животных. В работах других авторов показано, что после суточной материнской депривации в ПНД-9 у самцов крыс сниженный уровень лептина сохранялся в пубертатном периоде, но не у взрослых животных. У взрослых крыс уровень лептина обычно выше у самцов по сравнению с самками [21]. В нашей работе такое соотношение наблюдали у крыс-КОН в возрасте 2 мес. У крыс-МСИ половых разли-

чий в уровне лептина не было, что, возможно, связано с пониженной температурой изоляции крысят [22].

Вызванный МСИ дефицит лептина в раннем онтогенезе может оказывать существенное влияние на регуляцию иммунного ответа организма и на программирование развивающегося мозга. Показано, что лептин играет нейропротекторную роль, в частности, защищает нейроны от эксайтотоксических и оксидативных повреждений и участвует в развитии нейронов [23]. На основании приведенных фактов можно предположить, что снижение уровня лептина, обнаруженное у крыс-МСИ подросткового возраста, вовлечено в изменения развития ЦНС и наблюдаемые во взрослом возрасте нарушения поведения

Интересными представляются полученные нами данные изменения уровней хемокинов VEGF и фракталкина, а также уровня цитокина ИЛ-5 в сыворотке крыс-МСИ по сравнению с КОН. Уровни хемокинов снижались как у самцов, так и у самок-МСИ, однако динамика процесса зависела от пола животных. У сам-

Таблица 3/Table 3

Изменение некоторых цитокинов/хемокинов в зависимости от пола и возраста крыс, подвергнутых сепарации от матери и изоляции от однопометников в неонатальном периоде по сравнению с контрольной группой животных, выращенных с матерью
Changes in some cytokines/chemokines depending on the sex and age of rats subjected to maternal separation and isolation from littermates in the neonatal period compared with the control group of animals raised with their mother

	1 месяц		2 месяца		11 месяцев	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Провоспалительные						
ИЛ1-beta	=	=	=	=	=	↑↑
ИЛ6	=	=	=	↑↑	=	=
ИЛ12-P70	=	=	=	↑↑	=	=
ИЛ-18						↑
ИЛ2	=	=	=	=	=	↑
ИЛ5	↑	=	=	↑	=	=
Противовоспалительные						
ИЛ10	=	=	=	↓↓	=	↑↑
Хемокины						
VEGF	↓↓	=	=	↓	=	↑↑
Фракталкин	↓↓	=	=	↓↓	=	↑↑
IP10	=	=	↓↓	↑↑	=	↑↑
MIP1-alfa	=	=	=	=	=	↑↑
LIX	=	=	=	↑	=	=
Leptine	↓↓	↓↓	=	=	=	=

Примечание. ↑ увеличение содержания; ↓ уменьшение содержания; = не отличается от контрольных значений.

Note. ↑ increase in content; ↓ decrease in content; = does not differ from the control values.

цов снижение анализов наблюдали в возрасте 1 мес, у самок их содержание снижалось в более поздние сроки – в возрасте 2 мес. В зрелом возрасте (11 мес) только самки-МСИ демонстрировали повышенный по сравнению с КОН уровень VEGF и фракталкина. Уровень ИЛ-5 повышался в группе МСИ у самцов-подростков и у молодых взрослых самок.

Хемокины из семейства VEGF относятся к многофункциональным трофическим факторам, которые модулируют работу ЦНС, усиливая ангиогенез, повышая проницаемость сосудов, устраняя дефекты их формирования [24]. VEGF участвует в развитии нейронов, в процессах синаптогенеза и синаптической пластичности, оказывает прямой нейротрофический и нейропротекторный эффект. Считается, что VEGF связан с нарушением эмоциональной регуляции, вовлечен в когнитивную деятельность и социальное поведение. Он играет важную роль в реакциях на стресс, а развитие стресс-индуцированных психопатологий связывают с дефицитом VEGF. Периферический VEGF называют в числе потенциальных биомаркеров аффективных расстройств. Повышенные уровни хемокина были обнаружены в плазме крови у лиц с депрессией по сравнению со здоровым контролем [25], что рассматривают как возможный компенсаторный механизм, способствующий нейропротекции. Считают, что VEGF оказывает защитное действие на DA-ергические и серотонинергические нейроны, нарушения которых могут привести к гиперактивности и импульсивному агрессивному поведению животных [26]. Также хемокины семейства VEGF вовлечены в реализацию стресс-реакции, по-видимому, посредством модуляции активности норадренергической системы [27]. Хронический социальный стресс повышал экспрессию мРНК VEGF в мозге, но снижал концентрацию VEGF в сыворотке у самок крыс. Можно предположить, что снижение уровня сывороточного VEGF у молодых крыс-МСИ ассоциировано с наблюдаемыми в нашей работе нарушениями двигательного, исследовательского и социального поведения животных. Снижение уровня VEGF в крови у самцов в более раннем по сравнению с самками периоде онтогенеза может отражать большую уязвимость самцов к повторяющемуся МСИ. Кроме того, несинхронное снижение уровня VEGF у самцов и самок может быть обусловлено разными механизмами, вовлеченными в регуляцию активности VEGF [27].

Наряду с VEGF, нейротрофические и нейропротекторные функции в ЦНС опосредует фракталкин [28], который экспрессируется преимущественно в нейронах и регулирует активность микроглии, обе-

спечивая адгезию клеток в мембраносвязанной форме и действуя как аттрактант для воспалительных клеток (как местных, так и периферических) в растворимой форме. В развивающемся мозге фракталкин участвует в процессах синаптогенеза, синаптической пластичности и ремоделирования нейронных сетей путем синаптической обрезки (прунинга). Экспериментальные исследования по изучению роли фракталкина в эффектах СРВ немногочисленны. У крыс, подвергшихся пренатальному стрессу, нарушения поведения во взрослом возрасте сопровождалось снижением экспрессии мРНК фракталкина и концентрации белка в гиппокампе и фронтальной коре, с одновременным повышением уровня провоспалительных факторов в этих структурах; внутрижелудочковое введение фракталкина приводило к нормализации поведения и снижению нейровоспаления [29]. В литературе мы не нашли данных об уровне периферического фракталкина, полученных на трансляционных моделях психических расстройств.

Помимо уже упомянутых VEGF, фракталкина и ИЛ-5, уровень которых изменялся у самок-МСИ позже, чем у самцов, в возрасте 2 мес только у самок-МСИ наблюдали повышенные уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-12, LIX и сниженный уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Интерлейкины являются важными модуляторами развития ЦНС и ее дальнейшего функционирования. Провоспалительные цитокины ингибируют пролиферацию нейронов и контролируют синаптогенез, влияют на уровень нейротрансмиттеров в мозге [30]. Отметим, что ИЛ-6 может оказывать также противовоспалительное действие, и способствует выживанию катехоламинергических нейронов в мозге. В свою очередь, экспрессию провоспалительных цитокинов могут регулировать противовоспалительные цитокины, в том числе, ИЛ-10 [30]. ИЛ-10 участвует в процессах синаптогенеза в ЦНС, экспрессия его рецептора была обнаружена в нейронах гиппокампа на ранней стадии развития ЦНС.

Как уже упоминалось, периферический иммунный статус не всегда совпадает с уровнями цитокинов в ЦНС, особенно с учетом цитокиновой специфики разных отделов мозга. Тем не менее, провоспалительный профиль плазменных цитокинов рассматривают как возможный прогностический маркер уязвимости организма к стрессу и высокого риска развития нервно-психических нарушений [31]. Имеются данные о том, что периферические воспалительные факторы ИЛ-1 и ИЛ-6 связаны со стресс-индуцированными нарушениями социального поведения [7]. Пониженное содержание в крови ИЛ-10 также может при-

водить к дисрегуляции провоспалительных цитокинов, и повышенному риску развития соматических и нервно-психических патологий, в том числе постстрессовых эмоционально-мотивационных нарушений [28].

Показано, что СРВ изменяет экспрессию цитокинов на периферии и в мозге во время развития и во взрослом возрасте. Точный профиль изменений зависит от многих факторов и, по-видимому, является весьма варибельным, однако общее направление изменений — сдвиг баланса в сторону преобладания провоспалительных цитокинов, которые могут нарушать ГЭБ и активировать центральные иммунные реакции [32]. Провоспалительный профиль цитокинов, выявленный в наших экспериментах у молодых взрослых самок-МСИ может свидетельствовать о стойких изменениях иммунной модуляции, вызванных СРВ.

Заслуживают внимания полученные нами данные о разнонаправленных сдвигах хемокина IP-10 у молодых взрослых крыс-МСИ: уровень белка был снижен у самцов-МСИ и повышен у самок. В мозге этот хемокин секретируется нейронами, глией и стромальными клетками в ответ на IFN- γ и действует как хемоаттрактант Т-клеток и естественных клеток-киллеров в ЦНС. В экспериментах по изучению влияния транскраниальной лазерной стимуляции на поведение и когнитивную деятельность крыс улучшение обучения и память у старых животных сопровождалось снижением IP-10 в гиппокампе [33]. Мета-анализ клинических данных о периферических уровнях цитокинов/хемокинов у пациентов с различными психиатрическими диагнозами выявил повышенный уровень IP-10 у лиц с биполярным расстройством, но только в состоянии эутимии [34]. В связи с ограниченным объемом сведений о связи IP-10 с психическими заболеваниями и стресс-индуцированными нарушениями, преждевременно делать заключения о физиологическом значении зависимых от пола изменений уровня IP-10 у крыс-МСИ.

Самки-МСИ старшего возраста (11 мес) демонстрировали повышенные по сравнению с контрольными значениями уровни ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-18, IP-10, MIP-1 α , VEGF и фракталкина. Можно предположить, что увеличение содержания периферических маркеров воспаления связано со старением животных. Особенностью стареющих тканей является бессимптомное хроническое воспаление низкой степени тяжести («стерильное» воспаление), отражающее накопление поврежденных макромолекул, вредных продуктов микробного происхождения и т.д. На самцах линии Fisher показано, что с возрастом у них увеличивалось содержание ряда провоспалительных плазменных ци-

токинов/хемокинов [3]. Возможно, у самок-МСИ этот процесс начинается раньше, чем у самцов. С другой стороны, нельзя исключить, что эти сдвиги в содержании сывороточных цитокинов являются отсроченными эффектами МСИ.

Функциональная активность системы комплемента. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что у молодых взрослых крыс-КОН функциональная активность классического пути системы комплемента была выше у самцов, чем у самок. У крыс-МСИ наблюдали обратное соотношение за счет снижения скорости лизиса эритроцитов комплементом у самцов и повышения — у самок. Интересно, что в подростковом возрасте функциональная активность классического пути системы комплемента была одинаково низкой у крыс обоего пола.

Система комплемента является ключевой частью врожденного иммунитета. Однако ее созревание продолжается вплоть до подросткового возраста [35], а в дальнейшем врожденный иммунный ответ может меняться на протяжении всей жизни, по-разному влияя на мозг и поведение. Незрелость системы комплемента при рождении и в детстве делает ее уязвимой для стресса, который может навсегда изменить ход развития нейроиммунного взаимодействия.

Белки каскада комплемента секретируются гепатоцитами печени и почти всеми типами клеток ЦНС [6]. Расщепление этих белков приводит к образованию фрагментов, которые функционируют как сигнальные молекулы. Фрагменты (C3a, C5a), действуя на иммунные клетки, индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов и накопление макрофагов, а их взаимодействие с тканеспецифическими клетками (например, с нейронами) регулирует пролиферацию клеток-мишеней. В здоровом развивающемся мозге активация комплемента приводит к образованию компонента C3b, который опсонизирует синапсы для элиминации макрофагами и, наряду с молекулами фракталкина, участвует в прунинге и ремоделировании нейронных сетей. В зрелом мозге этот процесс существенно подавлен [36]. Стресс активирует секрецию провоспалительных цитокинов, которые помогают организовать дальнейший иммунный ответ, в т.ч. активацию белков системы комплемента [37]. Показано, что у крыс хронический психологический стресс индуцирует ремоделирование нейронных сетей в мозге (в частности, в центральном ядре миндалины) и способствует развитию тревожно-подобного поведения [38].

В свете сказанного, интерпретация наших данных о зависимом от пола изменении активности си-

стемы комплемента у молодых взрослых крыс может быть неоднозначной. С одной стороны, повышенная активность системы комплемента может свидетельствовать об общей провоспалительной направленности иммунного ответа у самок-МСИ, тогда как у самцов в этом возрасте нормализация цитокинового профиля сопровождалась снижением активности системы комплемента. С другой стороны, реакция системы комплемента может быть компенсаторной, направленной на ремоделирование нейронных связей, нарушенных МСИ. В таком случае самцы оказываются более уязвимыми к СРВ. Можно также предположить, что в основе наблюдаемых различий в иммунных реакциях лежит разная скорость созревания нейронных и иммунных связей у самцов и самок крыс, и отставленные эффекты МСИ будут проявляться неодинаково в разном возрасте.

Заключение

По совокупности данных можно заключить, что МСИ может влиять на поведенческие, эндокринные и иммунные характеристики самцов и самок крыс по-разному: самцы демонстрируют нарушения в более раннем (подростковом) возрасте. У самок дисфункции начинают развиваться позже, но сохраняются, по крайней мере, до среднего взрослого возраста. Одним из возможных механизмов таких отличий могут быть разные пути реализации нейроиммунных реакций, индуцированных ранними авersive событиями.

Литература

(пп. 1–9; 11–38 см. References)

10. Карганов М.Ю., Шойбонов Б.Б., Алчинова И.Б., Мавренкова П.В., Деморжи М.С., Терешкина Н.В. др. *Скрининг-тест для определения функциональной активности системы комплемента крысы – патент на изобретение № 2786208 от 19.12.2022.*

References

1. Shin S.H., Kim Y.K. Early life stress, neuroinflammation, and psychiatric illness of adulthood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2023; 1411: 105-34. https://doi.org/10.1007/978-981-19-7376-5_6
2. Quagliato L.A., Coelho D.A., de Matos U.M.A., Nardi A.E. Physical abuse during childhood predicts IL-2R levels in adult panic disorder patients. *J. Affect. Disord.* 2021; 295: 1440-4. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.09.022>
3. Budamagunta V., Kumar A., Rani A., Bean L., Manohar-Sindhu S., Yang Y., et al. Effect of peripheral cellular senescence on brain aging and cognitive decline. *Aging Cell.* 2023; 22(5): e13817. <https://doi.org/10.1111/acer.13817>
4. Cattane N., Vernon A.C., Borsini A., Scassellati C., Endres D., Capuron L., et al. Preclinical animal models of mental illnesses to translate findings from the bench to the bedside: Molecular brain mechanisms and peripheral biomarkers associated to early life stress

or immune challenges. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2022; 58: 55-79. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2022.02.002>

5. Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B., Demorzhi M.S., Shoibonov B.B., Karganov M.Y. Effects of maternal separation and subsequent stress on behaviors and brain monoamines in rats. *Brain Sci.* 2023; 13(6): 956. <https://doi.org/10.3390/brainsci13060956>
6. Reddaway J., Brydges N.M. Enduring neuroimmunological consequences of developmental experiences: From vulnerability to resilience. *Mol. Cell. Neurosci.* 2020; 109: 103567. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103567>
7. Duque E.D., Munhoz C.D. The pro-inflammatory effects of glucocorticoids in the brain. *Front. Endocrinol.* 2016; 28(7): 78. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00078>
8. Hodes G.E., Bangasser D., Sotiropoulos I., Kokras N., Dalla C. Sex differences in stress response: classical mechanisms and beyond. *Curr. Neuropharmacol.* 2024; 22(3): 475-94. <https://doi.org/10.2174/1570159X22666231005090134>
9. Solarz A., Majcher-Maślanka I., Kryst J., Chocyk A. Early-life stress affects peripheral, blood-brain barrier, and brain responses to immune challenge in juvenile and adult rats. *Brain Behav, Immun.* 2023; 108: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.11.005>
10. Karganov M.Yu., Shoybonov B.B., Alchinova I.B., Mavrenkova P.V., Demorzhi M.S., Tereshkina N.V., et al. *Screening test for determining the functional activity of the rat complement system – patent for invention No.2786208 dated 12/19/2022. [Skрининг-тест dlya opredeleniya funktsionalnoy aktivnosti sistemy komplementa krysy – patent na izobreteniyе № 2786208 ot 19.12.2022].* (In Russian)
11. White J.D., Kaffman A. The moderating effects of sex on consequences of childhood maltreatment: from clinical studies to animal models. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 1082. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01082>
12. Mishra P.K., Kutty B.M., Laxmi T.R. The impact of maternal separation and isolation stress during stress hyporesponsive period on fear retention and extinction recall memory from 5-week-to 1-year-old rats. *Exp. Brain Res.* 2019; 237(1): 181-90. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5411-3>
13. Rincón-Cortés M. Sex differences in addiction-relevant behavioral outcomes in rodents following early life stress. *Addict. Neurosci.* 2023; 6: 100067. <https://doi.org/10.1016/j.addicn.2023.100067>
14. Zanta N.C., Assad N., Suchecki D. Neurobiological mechanisms involved in maternal deprivation-induced behaviours relevant to psychiatric disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 2023; 16: 1099284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1099284>
15. Lundberg S., Martinsson M., Nylander I., Roman E. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Horm. Behav.* 2017; 87: 137-44. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.016>
16. Burke A.R., Miczek K.A. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014; 231(8): 1557-80. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3369-1>
17. Biggio F., Pisu M.G., Garau A., Boero G., Locci V., Mostallino M.C., et al. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014; 24(7): 1152-61. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.03.009>
18. Langgartner D., Fuchsl A.M., Kaiser L.M., Meier T., Foertsch S., Busch C., et al. Biomarkers for classification and class prediction of stress in a

- murine model of chronic subordination stress. *PLoS One*. 2018; 13(9): e0202471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202471>
19. Velloso L.A., Savino W., Mansour E. Leptin action in the thymus. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2009; 1153: 29-34. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03973.x>
 20. Pralong F.P., Roduit R., Waeber G., Castillo E., Mosimann F., Thorens B., et al. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1998; 139(10): 4264-8. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6254>
 21. Mela V., Diaz F., Vazquez M.J., Argente J., Tena-Sempere M., Viveros M.P., et al. Interaction between neonatal maternal deprivation and serum leptin levels on metabolism, pubertal development, and sexual behavior in male and female rats. *Biol. Sex. Differ.* 2016; 7: 2. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0054-6>
 22. Raff H., Hoeynck B., Jablonski M., Leonovicz C., Phillips J.M., Gehrand A.L. Insulin sensitivity, leptin, adiponectin, resistin, and testosterone in adult male and female rats after maternal-neonatal separation and environmental stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018; 314(1): 12-21. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00271.2017>
 23. Viveros M.P., Llorente R., López-Gallardo M., Suarez J., Bermúdez-Silva F., De la Fuente M., et al. Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(1): 217-26. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.015>
 24. Newton S.S., Fournier N.M., Duman R.S. Vascular growth factors in neuropsychiatry. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70(10): 1739-52. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1281-9>
 25. Kahl K.G., Bens S., Ziegler K., Rudolf S., Kordon A., Dibbelt L., Schweiger U. Angiogenic factors in patients with current major depressive disorder comorbid with borderline personality disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(3): 353-7. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.09.016>
 26. Sun P., Wei S., Wei X., Wang J., Zhang Y., Qiao M., et al. Emotional stress influences VEGF/VEGFR2 and its induced PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Neural. Plast.* 2016; 2016: 4129015. <https://doi.org/10.1155/2016/4129015>
 27. Nowacka-Chmielewska M.M., Paul-Samojedny M., Bielecka-Wajdman A.M., Barski J.J., Obuchowicz E. Alterations in VEGF expression induced by antidepressant drugs in female rats under chronic social stress. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(2): 723-30. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4022>
 28. Modzelewski S., Oracz A., Hendo K., Sokół A., Waszkiewicz N. Biomarkers of postpartum depression: a narrative review. *J. Clin. Med.* 2023; 14; 12(20): 6519. <https://doi.org/10.3390/jcm12206519>
 29. Ślusarczyk J., Trojan E., Wydra K., Głombik K., Chamera K., Kucharczyk M., et al. Beneficial impact of intracerebroventricular fractalkine administration on behavioral and biochemical changes induced by prenatal stress in adult rats: possible role of NLRP3 inflammasome pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2016; 113: 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.008>
 30. Brydges N.M., Reddaway J. Neuroimmunological effects of early life experiences. *Brain Neurosci. Adv.* 2020; 4: 2398212820953706. <https://doi.org/10.1177/2398212820953706>
 31. Baumeister D., Akhtar R., Ciufolini S., Pariante C.M., Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α . *Mol. Psychiatry*. 2016; 21(5): 642-9. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.67>
 32. Peng Z., Peng S., Lin K., Zhao B., Wei L., Tuo Q., et al. Chronic stress-induced depression requires the recruitment of peripheral Th17 cells into the brain. *J. Neuroinflammation*. 2022; 19(1): 186. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02543-6>
 33. Cardoso F.D.S., de Souza Oliveira Tavares C., Araujo B.H.S., Mansur F., Lopes-Martins R.Á.B., Gomes da Silva S. Improved spatial memory and neuroinflammatory. Profile changes in aged rats submitted to photobiomodulation therapy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022; 42(6): 1875-86. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01069-4>
 34. Misiak B., Bartoli F., Carrà G., Matecka M., Samochowiec J., Jaroš K., et al. Chemokine alterations in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* 2020; 88: 870-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.013>
 35. Dowling D.J., Levy O. Ontogeny of early life immunity. *Trends. Immunol.* 2014; 35(7): 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.007>
 36. Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G., Koyama R., Mardinly A.R., Yamasaki R., et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012; 74(4): 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
 37. Agorastos A., Pervanidou P., Chrousos G.P., Baker D.G. Developmental trajectories of early life stress and trauma: a narrative review on neurobiological aspects beyond stress system dysregulation. *Front Psychiatry*. 2019; 10: 118. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00118>
 38. Yuan T., Orock A., Greenwood-Van Meerveld B. Amygdala microglia modify neuronal plasticity via complement C1q/C3-CR3 signaling and contribute to visceral pain in a rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021; 320(6): 1081-92. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00123.2021>

Сведения об авторах:

Мавренкова Полина Вячеславовна, аспирант, лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Хлебникова Надежда Николаевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП;

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Шойбонов Батожаб Батожаргалович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., лаб. фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;

Порошина Алина Сергеевна, ст. исследователь группы клеточных методов, ООО «Экзактэ Лабс»;

Деморжи Марина Сергеевна, науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, mkarganov@mail.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 547.1`1:615.06

Алхусейн-Кулягинова М.С.¹, Додохова М.А.¹, Воронова О.В.^{1,2}, Котиева Е.М.¹, Котиева В.М.¹, Васильев И.В.¹, Климова Л.Ю.¹, Гулян М.В.¹, Шпаковский Д.Б.³, Милаева Е.Р.³, Котиева И.М.¹

Патоморфологическая оценка неспецифического токсического воздействия гибридных оловоорганических соединений в метрономном режиме введения

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

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

²ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро»,

344015, Ростов-на-Дону, Россия, Благодатная ул., 170А;

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

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

Введение. Эффективность стандартных схем противоопухолевой терапии ставится под сомнение в связи с отсутствием абсолютной специфичности к опухолевым клеткам, развитием лекарственной устойчивости и тяжелых побочных эффектов, особенно выраженных при лечении пациентов с III и IV стадиями злокачественных новообразований. Метрономный режим введения противоопухолевых лекарственных средств может быть успешно применен в паллиативной химиотерапии. Большинство исследований в области экспериментальной химиотерапии сосредоточено на поиске агентов, их комбинаций, доз и режимов введения, которые максимально воздействуют на опухолевые клетки при минимальной системной токсичности. **Цель исследования** – морфологическая оценка неспецифического токсического воздействия соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (бис-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)тиолат диметилолова (Me-3) и (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)тиолат трифенилолова (Me-5)) при метрономном режиме введения.

Методика. Исследование было выполнено на самках мышей линии C57BL/6 8 недельного возраста массой 21-22 г. Гибридные оловоорганические соединения (Me-3 и Me-5) вводили в метрономном режиме на протяжении 10 дней в суммарной дозе 375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно. Контрольным животным вводили раствор носителя (1% раствор желатина). Тестируемые соединения вводили 1 раз в сутки внутривенно. Через 8 суток после введения производили эвтаназию на гильотине. Для морфологического исследования выделяли органы: сердце, печень и почки. Проводилось микроскопическое исследование и фотофиксация гистологических срезов образцов при 20-кратном увеличении с помощью светового микроскопа «LEICA DM 4000 B», фиксировалось наличие или отсутствие дистрофических, воспалительных изменений и компенсаторно-приспособительных реакций.

Результаты. В метрономном режиме воздействие соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3 и Me-5) не имеет значительных необратимых морфологических изменений в жизненно важных паренхиматозных органах и сердце, что обуславливает целесообразность дальнейшей разработки гибридных оловоорганических соединений в качестве химиотерапевтических агентов для паллиативной терапии злокачественных новообразований на моделях *in vivo*.

Ключевые слова: металлоорганические соединения; оловоорганические соединения; доклинические исследования; морфологические методы исследования; неспецифическая токсичность; метрономный режим введения

Для цитирования: Алхусейн-Кулягинова М.С., Додохова М.А., Воронова О.В., Котиева Е.М., Котиева В.М., Васильев И.В., Климова Л.Ю., Гулян М.В., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р., Котиева И.М. Патоморфологическая оценка неспецифического токсического воздействия гибридных оловоорганических соединений в метрономном режиме введения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(3): 54-67.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.54-67

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Додохова М.А., Воронова О.В., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р., Котиева И.М.; сбор и обработка материала – Алхусейн-Кулягинова М.С., Котиева Е.М., Котиева В.М., Гулян М.В.; статистическая обработка – Васильев И.В., Климова Л.Ю.; написание текста – Гулян М.В., Алхусейн-Кулягинова М.С., Додохова М.А.; редактирование – Котиева И.М., Милаева Е.Р. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Алхусейн-Кулягинова *Маргарита Стефановна*, e-mail: rita.kuljaginva@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.01.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Alkhusein-Kulyaginova M.S.¹, Dodokhova M.A.¹, Voronova O.V.^{1,2}, Kotieva E.M.¹, Kotieva V.M.¹, Vasiliev I.V.¹, Klimova L.Y.¹, Gulyan M.V.¹, Shpakovsky D.B.³, Milaeva E.R.³, Kotieva I.M.¹

Pathomorphological assessment of nonspecific toxic effect of hybrid organotin compounds in metronomic mode of administration

¹Rostov State Medical University,

Rostov-na-Donu, 29 Nakhichevanskiy Pereulok, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation;

²Pathology and Anatomy Bureau,

170A Blagodatnaya St., Rostov-on-Don, 344015, Russian Federation;

³Lomonosov Moscow State University,

1 Vorobyovy (Leninskie) Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. The effectiveness of standard antitumor therapy regimens is questioned due to lack of absolute specificity to tumor cells, the development of drug resistance, and severe side effects that are especially pronounced in patients with III and IV stages of malignant neoplasms. Metronomic administration of antitumor drugs can be successfully applied in palliative chemotherapy. Most research in the field of experimental chemotherapy focuses on the search for new agents, their combinations, doses, and administration modes that maximize the effect on tumor cells with minimal systemic toxicity. **The aim** of this study was to morphologically assess the nonspecific toxicity of the compounds with an alleged antitumor effect, bis-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) dimethyltin (Me-3) and (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) triphenyltin (Me-5), when administered metronomically.

Methods. The study was performed on 8-week-old female C57Bl/6 mice weighing 21–22 g. Hybrid organotin compounds (Me-3 and Me-5) were administered metronomically for 10 days at a total dose of 375 mg/kg and 250 mg/kg, respectively. Control animals were injected with the carrier solution (1% gelatin solution). The tested compounds were administered intraperitoneally once a day. Guillo-tine euthanasia was performed 8 days after administration. The heart, liver, and kidneys were isolated for morphological study. Microscopic examination and photographic recording of histological sections was carried out at 20X magnification using a LEICA DM 4000 B light microscope. The presence or absence of dystrophic or inflammatory alterations and compensatory adaptive reactions was recorded.

Results. When administered metronomically, the effect of Me-3 and Me-5 compounds with an alleged antitumor effect did not produce significant, irreversible morphological changes in vital organs. This makes it advisable to further develop hybrid organotin compounds as chemotherapeutic agents for palliative therapy of malignant neoplasms in *in vivo* models.

Keywords: organometallic compounds; organotin compounds; preclinical studies; morphological research methods; nonspecific toxicity; metronomic administration regimen

For citation: Alkhusein-Kulyaginova M.S., Dodokhova M.A., Voronova O.V., Kotieva E.M., Kotieva V.M., Vasiliev I.V., Klimova L.Y., Gulyan M.V., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R., Kotieva I.M. Pathomorphological assessment of nonspecific toxic effect of hybrid organotin compounds in metronomic mode of administration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2024; 68(3): 54–67. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.54-67

Author's contribution: concept and design of the study – Dodokhova M.A., Voronova O.V., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R., Kotieva I.M.; collection and processing of material – Alkhusein-Kulyaginova M.S., Kotieva E.M., Kotieva V.M., Gulyan M.V.; statistical processing – Vasiliev I.V., Klimova L.Y.; writing the text – Gulyan M.V., Alkhusein-Kulyaginova M.S., Dodokhova M.A.; editing the text – Kotieva I.M., Milaeva E.R. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Margarita S. Alhusein-Kulyaginova, Assistant of the Department of pathological physiology, Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, e-mail: rita.kuljaginva@rambler.ru

Information about the authors:

Alkhusein-Kulyaginova M.S., <https://orcid.org/0000-0001-5123-5289>

Dodokhova M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3104-827X>

Voronova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-0542-6900>

Kotieva E.M., <https://orcid.org/0000-0002-5595-8799>

Kotieva V.M., <https://orcid.org/0000-0003-1783-1073>

Vasiliev I.V., <https://orcid.org/0009-0004-1678-1785>

Klimova L.Y., <https://orcid.org/0000-0002-9812-8779>

Gulyan M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6023-8916>

Shpakovsky D.B., <https://orcid.org/0000-0002-7824-3382>

Milaeva E.R., <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>

Kotieva I.M., <https://orcid.org/0000-0002-2796-9466>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 29.01.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Злокачественные опухоли являются одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире, что обуславливает значимость поиска альтернативных терапевтических стратегий для разработки новых противоопухолевых препаратов. Эффективность стандартных схем противоопухолевой терапии ставится под сомнение в связи с отсутствием абсолютной специфичности к опухолевым клеткам, развитием лекарственной устойчивости и тяжелых побочных эффектов.

В реальной клинической химиотерапевтической практике толерантность пациента является одним из основных факторов, ограничивающих дозу цитотоксических агентов и ухудшающих прогноз лечения. Особое негативное значение неспецифическая токсичность приобретает при лечении пациентов с III и IV стадиями злокачественных новообразований. Метрономный режим введения противоопухолевых лекарственных средств предложен для использования в случаях диссеминированного онкологического процесса, и может быть успешно применен в паллиативной химиотерапии [1]. Данный режим введения лекарственных агентов включает применение относительно низких доз без перерывов в приеме [2].

Большинство исследований в области экспериментальной химиотерапии сосредоточено на поиске агентов и комбинаций агентов, а также доз и режимов введения, которые максимально воздействуют на опухолевые клетки при минимальной системной токсичности.

Металлоорганические соединения, будучи промежуточным звеном между классическими неорганическими и органическими производными, в последнее время вызвали большой интерес как потенциальные противоопухолевые препараты в связи с их разнообразной структурой и инновационными механизмами действия, а некоторые из них даже прошли клинические испытания [3].

На сегодняшний день оловоорганические соединения являются одними из самых широко изучаемых перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства [4, 5].

Оловоорганические соединения различного строения широко исследуются в качестве кандидатов в противоопухолевые средства на различных моделях злокачественных новообразований *in vitro* и *in vivo* [6, 7]. В нашей работе в метрономном режиме введения тестируются гибридные оловоорганические соединения, которые обладают высокими показателями безопасности применения [8], а также противоопухолевой и антиметастатической фармакологической активно-

стью на моделях солидных перевиваемых опухолей мышей [9, 10]

Цель данного исследования — морфологическая оценка неспецифического токсического воздействия соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (бис-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)тиолат диметилолова (Me-3) и (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)тиолат трифенилолова (Me-5)) при метрономном режиме введения.

Методика

Исследование было выполнено на самках мышей линии C57Bl/6 8-недельного возраста массой 21-22 гр. Животные получены из питомника НИЦ «Курчатовский институт» — ФГУП ПЛЖ «Рапполово». Все исследования выполнялись в соответствии с Международными и Российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных. Животные были разделены на 3 группы, в каждой группе количество особей было одинаковым — 8 штук. Гибридные оловоорганические соединения (Me-3 и Me-5) вводили в метрономном режиме на протяжении 10 дней в суммарной дозе 375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно. Контрольным животным вводили раствор носителя (1% раствор желатина). Тестируемые соединения вводили 1 раз в сутки внутривентриально. Через 8 сут после введения производили эвтаназию на гильотине. Для морфологического исследования выделяли сердце, печень и почки [11, 12]. Морфологическое исследование выполнено на базе патологоанатомического отделения клинической больницы «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Ростова-на-Дону». Образцы ткани для световой микроскопии фиксировали забуференным нейтральным 10% формалином. Гистологическая проводка образцов ткани осуществлялась в автоматическом вакуумном гистологическом процессоре ASP6025 (Leica, Germany). После проводки образцы ткани заливались в парафин с использованием модульной заливочной станции EG1150H (Leica, Germany). На ротационном микротоме RM2245 (Leica, Germany) из парафиновых блоков с образцами ткани изготавливали серийные срезы. Полученные гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по классическому протоколу. Микроскопическое исследование и фотофиксацию полученных гистологических препаратов осуществляли при 20-кратном увеличении с помощью светового микроскопа «LEICA DM 4000 B». Фотофиксация морфологической картины осуществлялась в 5 полях зрения каждого исследуемого гистологического препарата. Для гистоморфометрических исследований использована

автоматизированная система гистологического анализа с использованием аппаратно-программного модуля «Leica Application Suite (LAS)» на базе микроскопа Leica DM4000B с цифровой камерой Leica DFC490, предназначенная для измерения параметров тканевых и клеточных структур в автоматическом режиме.

При описании морфологических изменений исследуемых образцов оценивались:

1. для печени – состояние гепатоцитов и стромального компонента (синусоиды, центральные вены; артерия, вена, желчный проток портальных трактов);

2. для сердечной мышцы – состояние кардиомиоцитов и стромы с сосудами;

3. для почек – состояние клубочков, канальцев и стромы с сосудами;

По патологическим изменениям фиксировалось их наличие или отсутствие:

1) дистрофические: отек, некроз, фиброз, степень дистрофии и атрофии;

2) воспалительные: состав инфильтрата, степень выраженности процесса (слабая, умеренная, выраженная), распространенность (дискретная, диффузная);

3) компенсаторно-приспособительные: ангиоматоз, гиперплазия и гипертрофия клеток.

Оценку морфологических изменений проводили полуколичественным методом в баллах: 0б – отсутствие, 1б – слабая, 2б – умеренно выраженная, 3б – выраженная степень изменений. Степень развития

фиброза фиксировалась полуколичественным методом по тем же параметрам с гистохимической окраской препаратов по Ван Гизону.

Статистическая обработка полученных данных с учётом характера распределения проводилась параметрическими (t-критерий Стьюдента) и непараметрическими (U-критерий Манна–Уитни) методами. Все статистические процедуры проводились с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10.0» (StatSoft).

Результаты

Гистологическое исследование печени. При гистологическом исследовании печени животных нами получены следующие результаты: в печени животных контрольной группы при микроскопическом исследовании отмечался незначительный отек (0-1б), визуализировались портальные тракты с незначительным фиброзом, скудной воспалительной инфильтрацией (0-1б) (**рис. 1**).

При введении Me-3 на 18 сут регистрировали отек, неравномерное полнокровие центральных вен и синусоидных капилляров, с хорошей визуализацией этих структур (1б). Гепатоциты центральной части долек – в состоянии гиалиново-капельной дистрофии, местами в состоянии апоптоза, по периферии долек печеночные клетки в состоянии смешанной (мелко-крупнокапельной) жировой дистрофии (1-2б),

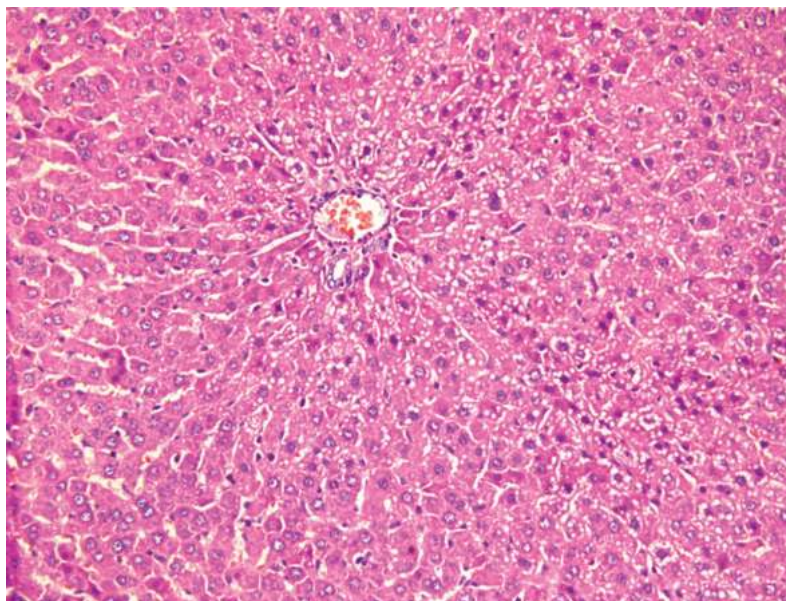


Рис. 1. Контрольная группа без лечения (печень). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 1. The control group without treatment (liver). Staining with hematoxylin and eosin, $\times 200$

портальные тракты обычных размеров, желчные протоки и вены триад с очаговой десквамацией эпителия и эндотелия, с единичными лимфоцитами в строме (рис. 2). При окраске по Ван Гизону

отмечается минимальный фиброзный компонент в портальных трактах (рис. 3).

При введении Ме-5 на 18 сут эксперимента в ткани печени выявлен резкий отек (3б), полнокровие цен-

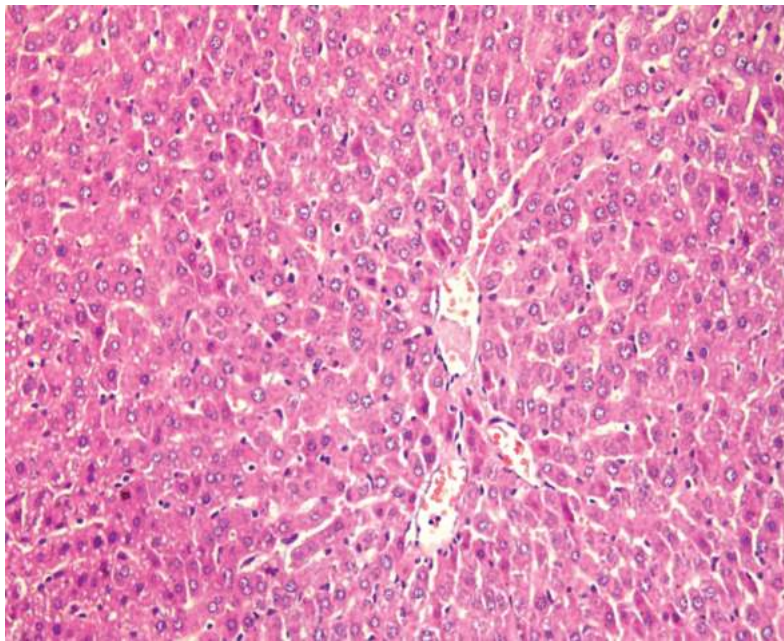


Рис. 2. Микроскопическая картина печени при введении Ме-3. Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 2. Microscopic picture of the liver after administration of Me-3. Staining with hematoxylin and eosin, ×200



Рис. 3. Микроскопическая картина печени при введении Ме-3. Окраска Ван Гизону, ×200.

Fig. 3. Microscopic picture of the liver after administration of Me-3. Van Gieson coloring, ×200.

тральных вен со стазом эритроцитов, синусоидные капилляры четко визуализируются, большей частью эктазированы, центролобулярные гепатоциты в мелкокапельной жировой дистрофии, апоптоз отдельных групп печеночных клеток, локусы некроза, очаговая пролиферация клеток Купфера, портальные тракты увеличены в размерах за счет отека, очагового фиброза, эпителий желчных протоков набухший, с неравномерной пролиферацией, сужением просвета (2-3б). В сосудах портальных трактов – сладж эритроцитов, уплощение эндотелия, местами с потерей выстилки, в строме единичные реактивные инфильтраты, состоящие преимущественно из лимфоцитов (1б), периваскулярные экстравазаты (рис. 4). При окраске по Ван Гизону четко визуализируется перипортальный фиброзный компонент, выраженный отек, нарушение реологии в микроциркуляторном русле, пролиферация желчных протоков с тенденцией к сужению просвета (2-3б) (рис. 5).

Гистологическое исследование почек. В ткани почек животных контрольной группы при микроскопическом исследовании выявлен незначительный перигломерулярный отек (0-1б), клубочки нормоклеточные с хорошо простматриваемыми капиллярными петлями, нефротелий проксимальных канальцев обычного гистологического строения, дискретно с признаками гиалиново-капельной дистрофии, в просвете единичных канальцев незначительное количество белковых

масс, строма не выражена, воспалительная инфильтрация при просмотре препаратов не регистрируется (0-1б) (рис. 6).

При введении Ме-3 отмечалось неравномерное полнокровие венулярного компонента сосудистого русла, гломерулы умеренноклеточные, увеличены, отмечается значительный перигломерулярный отек (1б), в интерстиции – отек, очаговые геморрагии, нефротелий канальцев в состоянии гиалиново-капельной дистрофии, местами некротизирован, в просвете некоторых проксимальных канальцев рыхлые белковые массы (0-1б) (рис. 7).

При окраске по Ван Гизону четко визуализируются сосуды и стромальный компонент (рис. 8).

При введении Ме-5 на 18 сут в почечной паренхиме выявлено полнокровие, гломерулы клеточные, пролиферация мезангиоцитов, клубочки разнокалиберные, большая часть из них коллабирована, имеет «лапчатый» вид, выраженный перигломерулярный отек (2-3б), в интерстиции – отек, очаговые геморрагии, нефротелий канальцев локально десквамирован, в состоянии гиалиново-капельной и гидропической дистрофии (3б), в просвете проксимальных канальцев фиксируются эозинофильные белковые массы (рис. 9). При окраске образцов ткани почки по ван Гизону регистрируется минимальное развитие фиброзной ткани, сопоставимое с нормальной гистологической картиной (0б) (рис. 10).

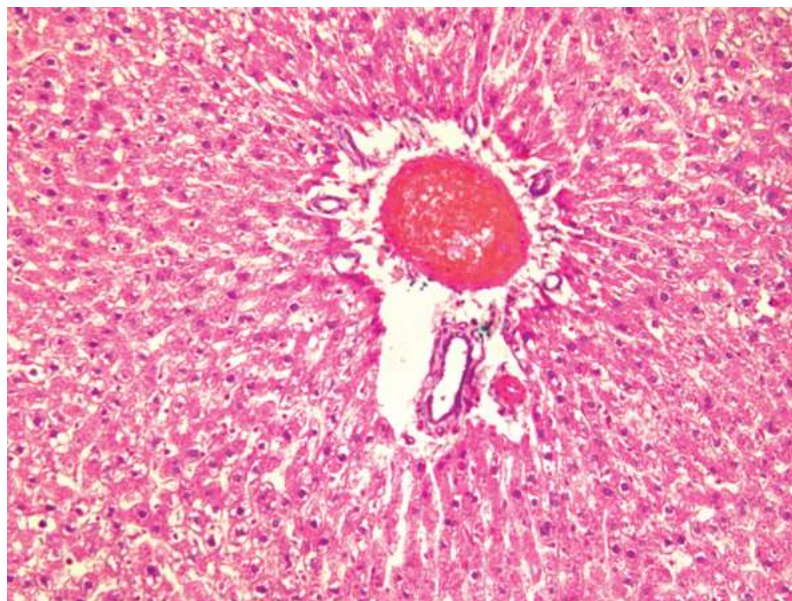


Рис. 4. Микроскопическая картина печени при введении Ме-5. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 4. Microscopic picture of the liver after administration of Me-5. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 200$.

Гистологическое исследование сердечной мышцы. При микроскопическом исследовании сердечной мышцы животных контрольной группы определяются равнонаправленные мышечные волокна, отсутствие межмышечного отека (0б) и гипертрофии кардиомиоцитов, мелкие ветви коронарных артерий

с широким просветом, полнокровные, минимальным количеством периваскулярного фиброза (0б) (рис. 11).

При введении Ме-3 на 18 сут выявлен умеренно выраженный межмышечный отек (1-2б), полнокровие, незначительная зернистость цитоплазмы, с единичными контрактурами, ядра части кардиомиоци-

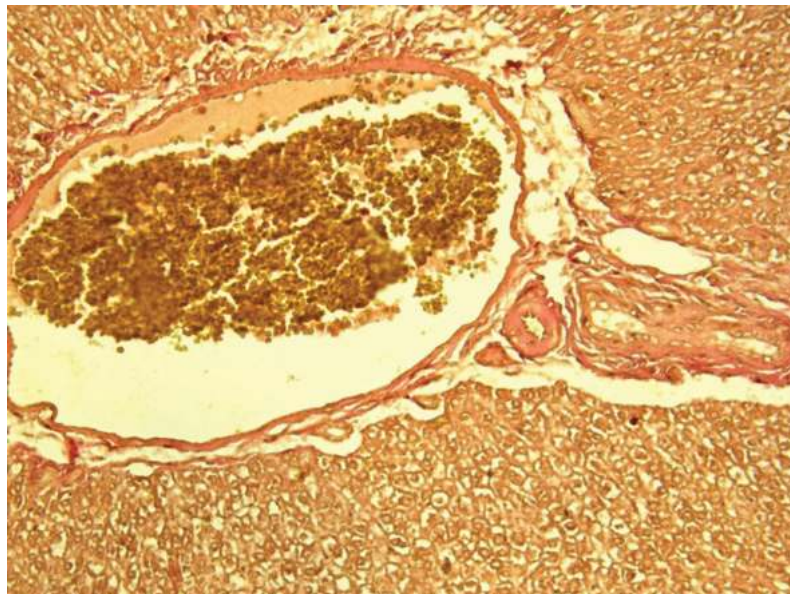


Рис. 5. Микроскопическая картина печени при введении Ме-5. Окраска по Ван Гизону, $\times 200$.

Fig. 5. Microscopic picture of the liver after administration of Me-5. Van Gieson coloring, $\times 200$.

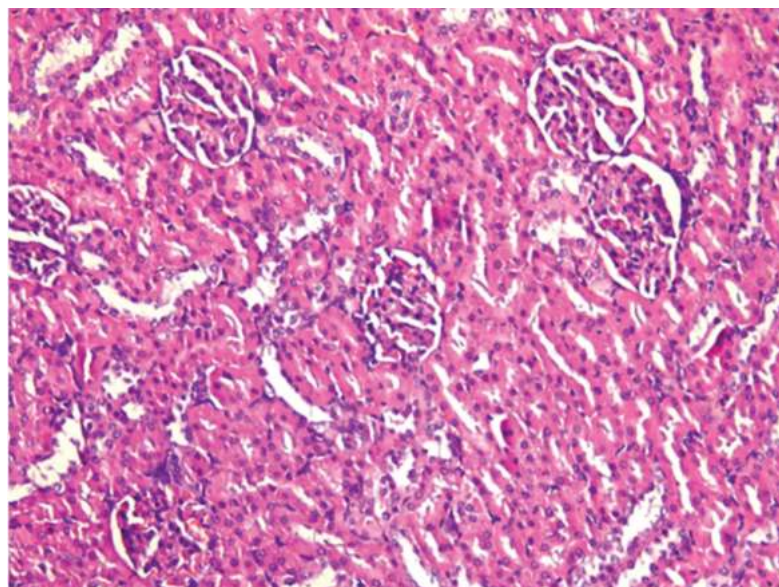


Рис. 6. Контрольная группа без лечения (почка). Окраска гематоксилином эозином, $\times 200$.

Fig. 6. The control group without treatment (kidney). Staining with hematoxylin eosin, $\times 200$.

тов увеличены, набухшие, одиночные — пикнотичны (1-2б), в строме — умеренный периваскулярный отек (рис. 12). При окраске образцов ткани сердечной мышцы по Ван Гизону определяется периваскулярное развитие фиброзной ткани (1б) (рис. 13).

При введении Ме-5 в те же сроки эксперимента выявлен выраженный отек (3б), полнокровие с пери-

васкулярными экстравазатами и очаговыми гемorragиями, кардиомиоциты с умеренно выраженными, местами резко выраженными дистрофическими изменениями, наличием мышечных контрактур, отеком цитоплазмы, увеличенными ядрами, с признаками дегенерация по типу кариолизиса, в ядрах кардиомиоцитов явления апоптоза и некроптоза, локусы

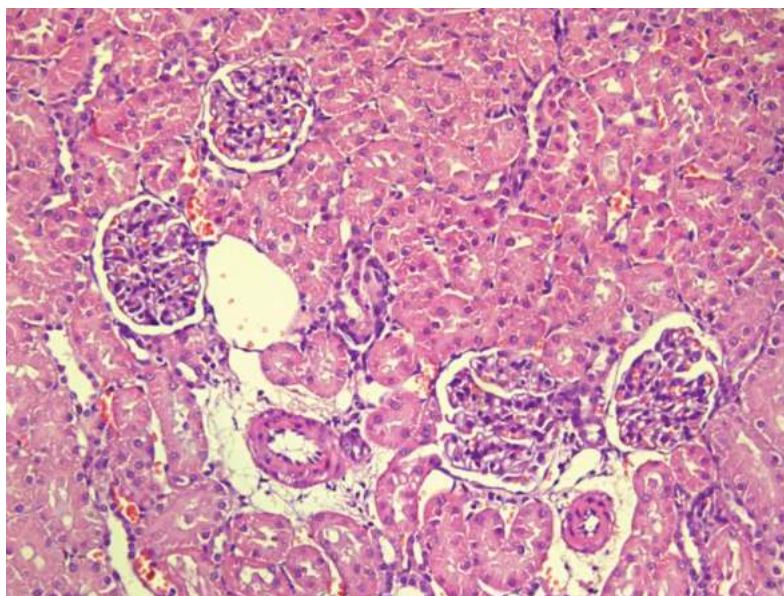


Рис. 7. Микроскопическая картина почки при введении Ме-3. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 7. Microscopic picture of the kidney with the introduction of Me-3. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 200$.

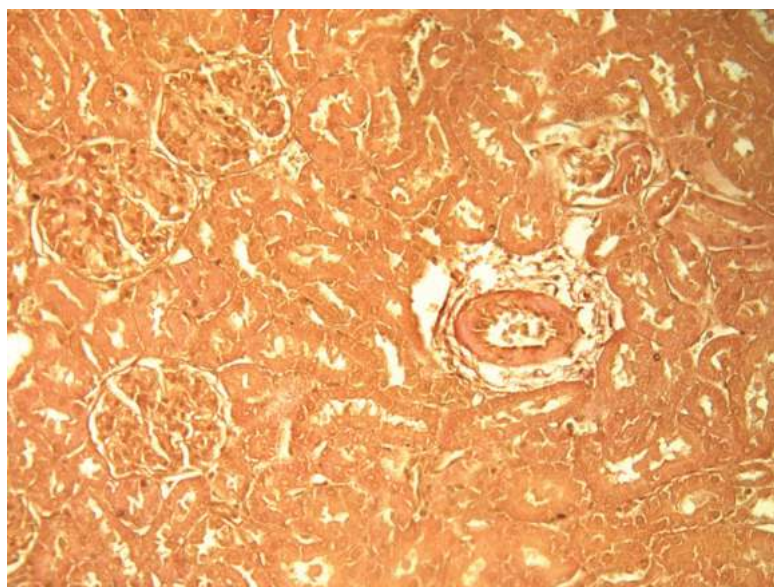


Рис. 8. Микроскопическая картина почки при введении Ме-3. Окраска по Ван Гизону, $\times 200$.

Fig. 8. Microscopic picture of the kidney with the introduction of Me-3. Van Gieson coloring, $\times 200$.

некроза кардиомиоцитов, единичные нейтрофилы (2-3б). В строме – отек, дистрофические изменения стенок мелких ветвей коронарных артерий с набуханием эндотелия (рис. 14). При окраске по Ван Гизону - умеренно выраженный межмышечный и периваскулярный отек, незначительная фибротизация стромы (2б). (рис. 15).

Обсуждение

К сожалению, цисплатин и другие препараты на основе платины вызывают серьезные мультифокальные полиорганные побочные эффекты. Поэтому комплексы неплатиновых металлов разрабатываются в качестве альтернативных противоопухолевых агентов. Среди

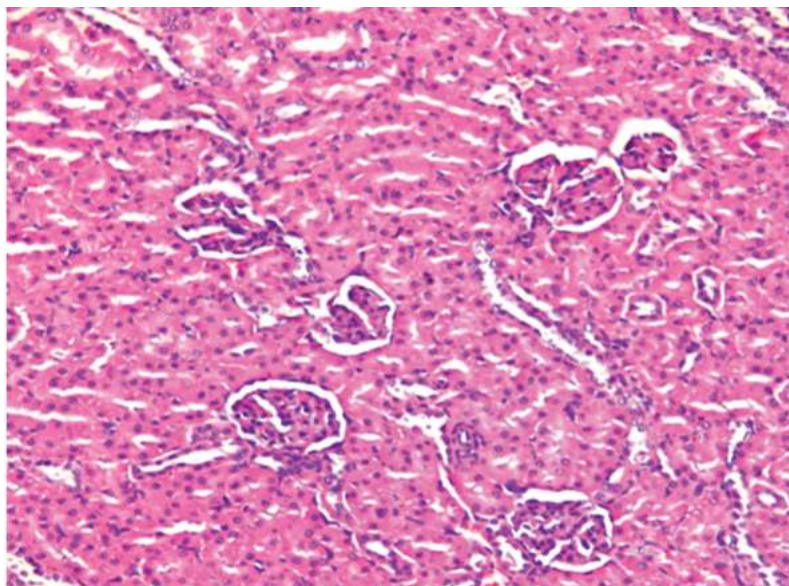


Рис. 9. Микроскопическая картина почки при введении Me-5. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

Fig. 9. Microscopic picture of the kidney with the introduction of Me-5. Staining with hematoxylin and eosin, ×200.

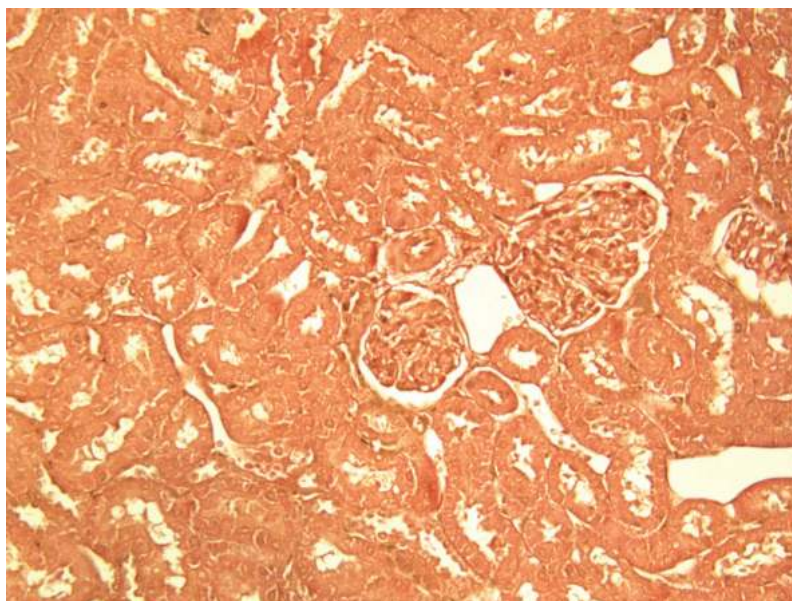


Рис. 10. Микроскопическая картина почки при введении Me-5. Окраска по Ван Гизону, ×200.

Fig. 10. Microscopic picture of the kidney with the introduction of Me-5. Van Gieson coloring, ×200.

неплатиновых металлокомплексов оловоорганические соединения являются наиболее эффективными кандидатами в онкологии, благодаря широкому спектру противораковой активности при относительно минимальной токсичности по отношению к здоровым клеткам, лучшему выведению из организма и меньшему количеству нежелательных эффектов, чем у препаратов платины [13, 14].

Низкомолекулярные оловоорганические соединения (триметилоловохлорид) при субхроническом введении приводят к кардиотоксическим изменениям, что может быть связано с угнетением активности и снижением содержания $Na^+ / K^+ -ATP$ азы, что в дальнейшем приводит к изменениям Bcl-2, Вах, каспазы-3 и расщепленной каспазы-3 в тканях желудочков мышей [15]. Патоморфологические изменения в печени при введе-

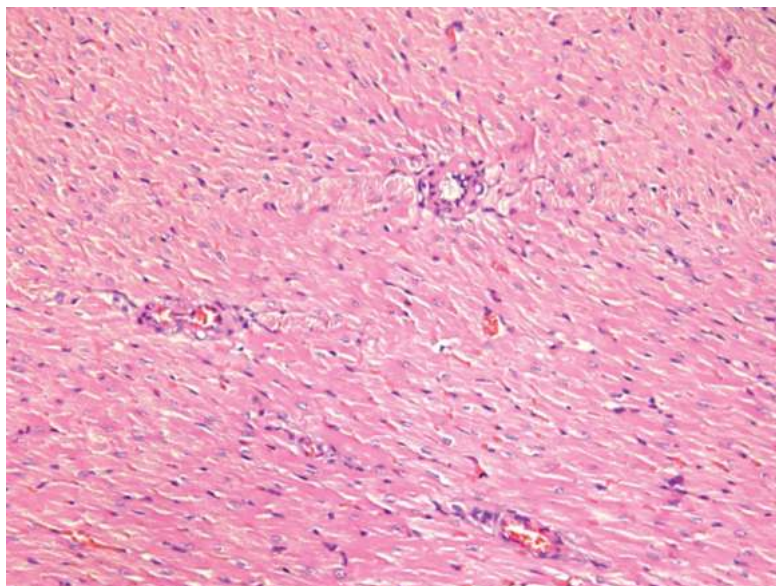


Рис. 11. Контрольная группа без лечения (миокард). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 11. The control group without treatment (myocardium). Staining with hematoxylin and eosin, $\times 200$.

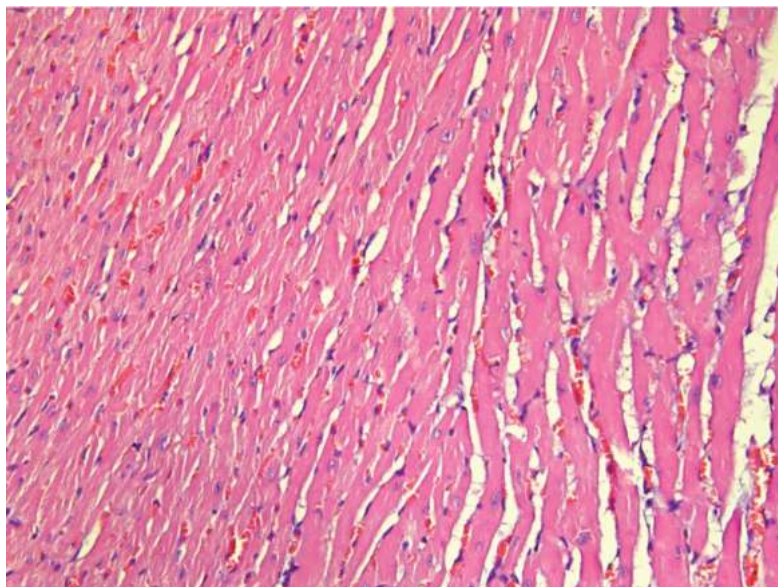


Рис. 12. Микроскопическая картина миокарда при введении Me-3. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 12. Microscopic picture of the myocardium with the introduction of Me-3. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 200$.

нии оловоорганических соединений можно охарактеризовать как хронический пролиферативный холангит с преобладающим повреждением и пролиферацией мел-

ких желчных протоков, а также вторичными портальными воспалительными клеточными инфильтратами и начинающимся портальным фиброзом [16, 17]. Воз-

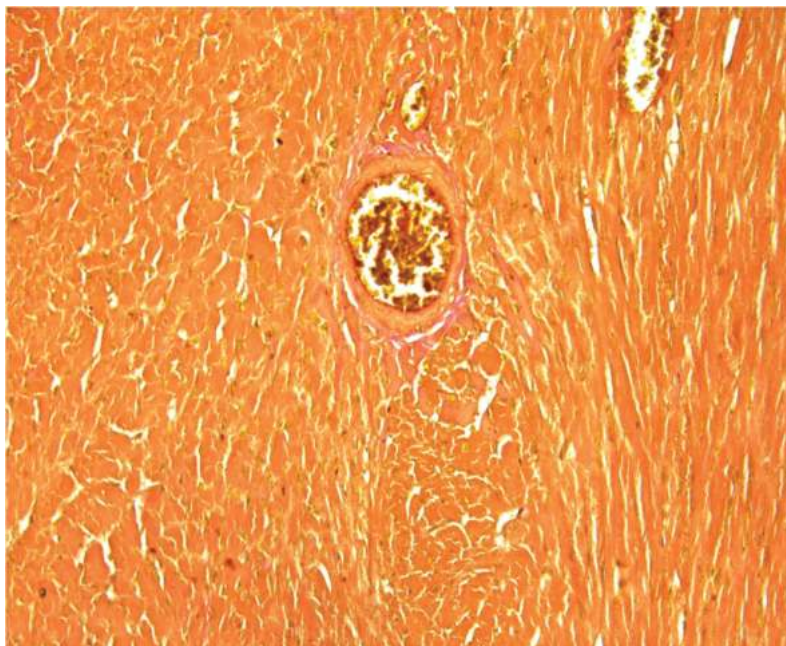


Рис. 13. Микроскопическая картина миокарда при введении Me-3. Окраска по Ван Гизону, $\times 200$.

Fig. 13. Microscopic picture of the myocardium with the introduction of Me-3. Van Gieson coloring, $\times 200$.

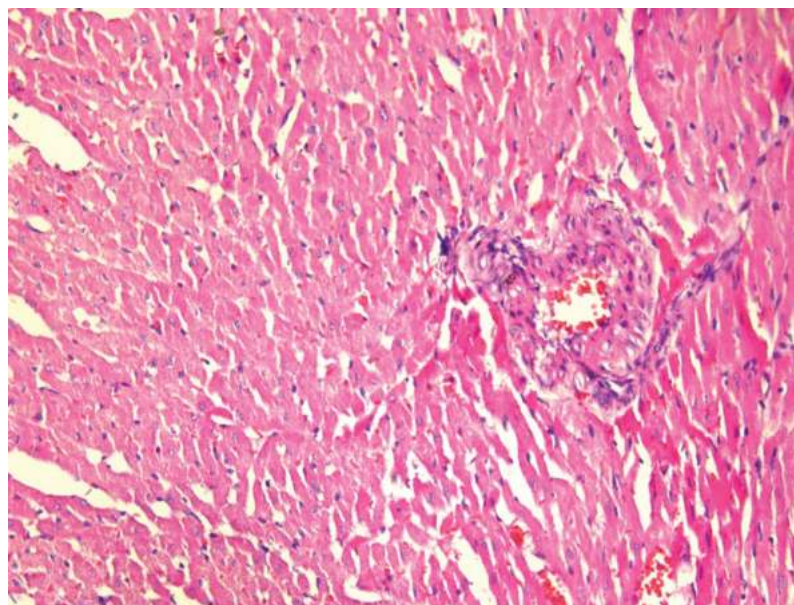


Рис. 14. Микроскопическая картина миокарда при введении Me-5.

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 14. Microscopic picture of the myocardium with the introduction of Me-5.

Staining with hematoxylin and eosin, $\times 200$.



Рис. 15. Микроскопическая картина миокарда при введении Me-5.

Окраска по Ван Гизону, $\times 200$

Fig. 15. Microscopic picture of the myocardium with the introduction of Me-5.

Van Gieson coloring, $\times 200$

Ткань/Тестируемое соединение	Контроль	Me-3	Me-5
Печень	$0,5 \pm 0,2$	$1,63 \pm 0,2$	$2,50 \pm 0,2^*$
Почки	$0,88 \pm 0,24$	$1,13 \pm 0,24$	$2,75 \pm 0,17^*$
Сердце	0	$1,5 \pm 0,2^*$	$2,13 \pm 0,32^*$

Примечание. * – отмечены группы, в которых изменения показателя является статистически достоверным ($p \leq 0,05$).

Note. * – marks the groups in which the change in the indicator is statistically significant ($p \leq 0.05$).

действие трибутилолова вызывало увеличение показателей окислительного стресса, таких как экспрессия супероксиддисмутазы и каталазы, а также увеличение продукции малонового диальдегида. Наконец, воздействие ТБТ приводило к утолщению интимы-медиа аорты. В совокупности эти данные предполагают потенциальный сердечно-сосудистый токсикологический эффект после подострого воздействия на крыс-самцов [18].

При описании морфологических изменений во всех без исключения исследуемых образцах выявлены и оценивались отек и дистрофические изменения ткани.

В таблице приведены средние показатели суммарного коэффициента (Средняя арифметическая (M) \pm средняя ошибка средней арифметической (m), в баллах), характеризующего отек и дистрофические изменения ткани (печень, почки, сердце).

В качестве протекторной лигандной группировки нами был использован антиоксидантный фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола, введение которого в молекулу низкомолекулярного оловоорганического соединения приводит к снижению неспецифического токсического воздействия соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом Me-3 и Me-5 при метронном режиме введения.

Заключение

Анализ материала при традиционном гистологическом исследовании с применением гистохимических окрасок позволяет сделать вывод, что в метронном режиме воздействие тестируемых соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3 и Me-5) не имеет значительных необратимых морфологических изменений в жизненно важных па-

ренхиматозных органах и сердце, что обуславливает целесообразность дальнейшей разработки гибридных оловоорганических соединений в качестве химиотерапевтических агентов для паллиативной терапии злокачественных новообразований на моделях *in vivo*.

Литература

(п.п. 2–5; 9; 10; 13–18 см. References)

1. Тилляшайхов М.Н., Камышов С.В. Особенности паллиативной химиотерапии на современном этапе (обзор). *Colloquium-journal*. 2020; 12-2(64): 23-8. <https://doi.org/10.24411/2520-6990-2020-11790>
6. Милаева Е.Р., Додохова М.А., Шпаковский Д.Б., Антоненко Т.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М. и др. Механизмы цитотоксического действия оловоорганических соединений. *Биомедицина*. 2021; 17(2): 88-99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-88-99>
7. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Сухорукова Н.В., Ганцгорн Е.В., Алхусейн-Кулягинова М.С. и др. Оценка фармакотерапевтического потенциала оловоорганических соединений *in vivo*. *Биофармацевтический журнал*. 2021; 13(3): 30-4. <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-3-30-34>
8. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Комарова Е.Ф., Трепель В.Г., Алхусейн-Кулягинова М.С. и др. Исследование острой пероральной токсичности оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола. *Уральский медицинский журнал*. 2021; 20(3): 73-7. <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-3-73-77>
11. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А. и др. Динамика тканевой системы регуляторов плазминогена при меланоме кожи на фоне хронической боли у самок мышей. *Трансляционная медицина*. 2018; 5(2): 38-46. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2018-5-2-38-46>
12. Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А. и др. Нейромедиаторные системы головного мозга самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической боли. *Патогенез*. 2017; 15(4): 49-55. <https://doi.org/10.25557/GM.2018.4.9749>

References

1. Tilljashajhov M.N., Kamyshev S.V. Features of palliative chemotherapy at the present stage (review). *Colloquium-journal*. 2020; 12-2(64): 23-8. <https://doi.org/10.24411/2520-6990-2020-11790> (in Russian)
2. Kweon S., Jeong Y.S., Chung S.W., Lee H., Lee H.K., Park S.J., et al. Metronomic dose-finding approach in oral chemotherapy by experimentally-driven integrative mathematical modeling. *Biomaterials*. 2022; 286: 121584. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121584>
3. Parveen S., Arjmand F., Tabassum S. Development and future prospects of selective organometallic compounds as anticancer drug candidates exhibiting novel modes of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 175: 269-86. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.062>
4. Devi J., Boora A., Rani M., Arora T. Recent advancements in organotin (IV) complexes as potent cytotoxic agents. *Anticancer Agents*

5. Attanzio A., Ippolito M., Girasolo M.A., Saiano F., Rotondo A., Rubino S., et al. Anti-cancer activity of di- and tri-organotin (IV) compounds with D-(+)-Galacturonic acid on human tumor cells. *J Inorg Biochem*. 2018; 188: 102-12. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.04.006>
6. Milaeva E.R., Dodoхова M.A., Shpakovskij D.B., Antonenko T.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., et al. Mechanisms of cytotoxic action of organotin compounds. *Biomeditsina*. 2021; 17(2): 88-99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-88-99> (in Russian)
7. Dodoхова M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Suhorukova N.V., Gancgorn E.V., Alhusejn-Kuljaginova M.S., et al. Assessment of the pharmacotherapeutic potential of organotin compounds *in vivo*. *Biopharmaceuticheskiy zhurnal*. 2021; 13(3): 30-34. <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-3-30-34> (in Russian)
8. Dodoхова M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Komarova E.F., Trepel' V.G., Alhusejn-Kuljaginova M.S., et al. Investigation of acute oral toxicity of organotin compounds containing a fragment of 2,6-di-tert-butylphenol. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2021; 20(3): 73-7. <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-3-73-77> (in Russian)
9. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. (2021) Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma. *Research Results in Pharmacology*. 2021 7(4): 81-8. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.7.71455>
10. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. (2022) Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a B16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes. *Research Results in Pharmacology* 8(1): 85-93. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.8.76363>
11. Kit O.I., Francijanc E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., et al. Dynamics of the tissue system of plasminogen regulators in skin melanoma on the background of chronic pain in female mice. *Translyatsionnaya meditsina*. 2018; 5(2): 38-46. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2018-5-2-38-46> (in Russian)
12. Kit O.I., Kotieva I.M., Francijanc E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., et al. Neurotransmitter systems of the brain of female mice in the dynamics of the growth of malignant melanoma reproduced against the background of chronic pain. *Patogenez*. 2017; 15(4): 49-55. <https://doi.org/10.25557/GM.2018.4.9749> (in Russian)
13. Devi J., Boora A., Rani M., Arora T. Recent advancements in organotin (IV) complexes as potent cytotoxic agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2023; 23(2): 164-91. <https://doi.org/10.2174/1871520622666220520095549>
14. Stefanizzi V., Minutolo A., Valletta E., Carlini M., Cordero F.M., Ranzenigo A., et al. Biological evaluation of triorganotin derivatives as potential anticancer agents. *Molecules*. 2023; 28: 3856. <https://doi.org/10.3390/molecules28093856>
15. Liu Z., Tian Z., Lv J., Liu W., Ma Y., Hu M., et al. Mechanism in bradycardia induced by Trimethyltin chloride: Inhibition activity and expression of Na⁺/K⁺-ATPase and apoptosis in myocardia. *J Toxicol Sci*. 2020; 45(9): 549-58. <https://doi.org/10.2131/jts.45.549>
16. Lütt F., Ehlers L., Nizze H., Jaster R. Different characteristics of chronic dibutyltin dichloride-induced pancreatici-

- tis and cholangitis in mouse and rat. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2020; 19(2): 169-74. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2019.10.007>
17. Mendes A.B.A., Motta N.A.V., Lima G.F., Autran L.J., Brazão S.C., Magliano D.C. et al. Evaluation of the effects produced by sub-acute tributyltin administration on vascular reactivity of male wistar rats. *Toxicology.* 2022; 15; 465: 153067. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153067>
18. He S., Li P., Li Z.-H. Review on endocrine disrupting toxicity of triphenyltin from the perspective of species evolution: Aquatic, amphibious and mammalian. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128711>

Сведения об авторах:

Алхусейн-Кулягинова Маргарита Стефановна, ассистент каф. патологической физиологии, ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, e-mail: rita.kuljaginva@rambler.ru;

Додохова Маргарита Авдеевна, доктор мед. наук, зав. центральной научно-исследовательской лабораторией, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, e-mail: dodohova@mail.ru;

Воронова Ольга Владимировна, канд. мед. наук, гл. врач ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро», 9043401873@mail.ru;

Котиева Елизавета Михайловна, студент, лаборант, ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, e-mail: elizaveta.kotieva@mail.ru;

Котиева Виолетта Михайловна, студент, лаборант, ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, e-mail: kotieva.violetta@mail.ru;

Васильев Игорь Вячеславович, студент, лаборант, ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, e-mail: ivkovih2003@gmail.ru;

Климова Лариса Юрьевна, ст. лаборант, ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, e-mail: Klimowa.lara2013@yandex.ru;

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

Шпаковский Дмитрий Борисович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаб. биоэлементоорганической химии каф. медицинской химии и тонкого органического синтеза, ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», химический факультет, e-mail: dmshpak@mail.ru;

Милаева Елена Рудольфовна, доктор хим. наук, проф., зав. каф. медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», химический факультет, e-mail: helenamilaeva@mail.ru;

Котиева Инга Мовлиевна, доктор мед. наук, проф., проректор по научной работе, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО РГМУ Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: kukulik70@mail.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 615.322

Маркова К.В., Торопова А.А., Разуваева Я.Г., Оленников Д.Н.

Влияние экстракта сухого *Klasea centauroides* (L.) Cassini на энергетические и антиоксидантные процессы в головном мозге при длительной алкогольной интоксикации

ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН,
670047, Республика Бурятия, Улан-Удэ, Россия, ул. Сахьяновой, д. 8

Введение. *Klasea centauroides* – многолетнее растение семейства *Asteraceae*, обладающее широким спектром биологически активных веществ и применяющееся в народной и традиционной медицинах с целью повышения устойчивости организма к психическим и физическим нагрузкам. **Цель исследования** – оценить влияние экстракта сухого *Klasea centauroides* на энергетические и антиоксидантные процессы головного мозга при длительной алкогольной интоксикации.

Методика. Опыт был проведен на 32 белых крысах Wistar массой 180-200 г. Крысы контрольной и опытных групп в течение 6 недель получали 40% этиловый спирт в дозе 10 мл/кг. Начиная с третьей недели эксперимента, животным внутривенно вводили экстракт сухой *K. centauroides* в дозе 100 мг/кг в течение 4-х недель. Функции дыхательной цепи митохондрий оценивали по активности NADH-дегидрогеназного и SDH комплексов в головном мозге. Развитие процессов свободнорадикального окисления липидов характеризовали по содержанию малонового диальдегида (МДА), состояние антиоксидантной системы определяли по активности ферментов – каталазы (CAT), супероксиддисмутазы (SOD), глутатионпероксидазы (GPx), глутатионредуктазы (GR) и содержанию восстановленного глутатиона (GSH) в головном мозге.

Результаты. В ходе исследования отмечено, что экстракт *K. centauroides* в условиях длительной интоксикации этанолом стимулирует активность NADH-дегидрогеназного комплекса и SDH комплекса в митохондриях головного мозга в 1,5 раза ($p \leq 0,01$). Применение *K. centauroides* способствует снижению содержания МДА на 27% ($p \leq 0,05$), оказывает положительное влияние на антиоксидантную систему, стимулируя активности SOD (в 1,2 раза; $p \leq 0,05$), GR (в 1,4 раза; $p \leq 0,05$) в гомогенате головного мозга.

Заключение. Таким образом, экстракт сухой *K. centauroides* в дозе 100 мг/кг на фоне длительной алкогольной интоксикации нормализует энергетические процессы, тормозит реакции свободнорадикального окисления и выработку активных форм кислорода (АФК), а также повышает уровень защиты эндогенной антиоксидантной системы в головном мозге.

Ключевые слова: экстракт сухой *Klasea centauroides* (L.) Cass.; длительная алкогольная интоксикация; окислительное фосфорилирование; антиоксидантное действие; головной мозг; белые крысы

Для цитирования: Маркова К.В., Торопова А.А., Разуваева Я.Г., Оленников Д.Н. Влияние экстракта сухого *Klasea centauroides* (L.) Cassini на энергетические и антиоксидантные процессы в головном мозге при длительной алкогольной интоксикации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 68-74.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.68-74

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Разуваева Я.Г., Оленников Д.Н.; сбор и обработка материала – Торопова А.А., Маркова К.В.; написание текста – Маркова К.В.; редактирование – Разуваева Я.Г. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех ее частей – все соавторы.

Для корреспонденции: Маркова Кристина Владимировна, e-mail: kristen_kartland@mail.ru

Финансирование. Исследования проведены в рамках выполнения темы Госзадания по проекту FWSM-2021-0005 (№ госрегистрации 121030100227-7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.02.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Markova K.V., Toropova A.A., Razuvaeva Ya.G., Olennikov D.N.

The neuroprotective effect of *Klasea centauroides* (L.) Cassini dry extract in long-term alcohol intoxication

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
8 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude, 670047, Republic of Buryatia, Russian Federation

Introduction. *Klasea centauroides* is a perennial plant of the *Asteraceae* family, which contains a broad array of biologically active substances and is used in folk and traditional medicine to increase the body's resistance to mental and physical stress.

Aim: To evaluate the effect of the *Klasea centauroides* dry extract on energy and antioxidative processes in brain cells during long-term alcohol intoxication.

Methods. The experiment was performed on 32 white Wistar rats weighing 180-200 g. The control and experimental groups received 40% ethyl alcohol at a dose of 10 ml/kg for 6 weeks. Starting from the third week of the experiment, the animals were intragastrically administered the *K. centauroides* dry extract at a dose of 100 mg/kg for 4 weeks. The functioning of the mitochondrial respiratory chain was assessed by the activity of NADH dehydrogenase and SDH complexes in the brain. The development of free-radical processes of lipid oxidation was determined by the concentration of malondialdehyde (MDA). The state of the antioxidant system was determined by the enzymic activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR), and the concentration of reduced glutathione (GSH) in the brain.

Results. The study showed that the *K. centauroides* extract increased the activities of the NADH dehydrogenase complex and SDH complex in brain mitochondria by 1.5 times under the conditions of long-term ethanol intoxication ($p \leq 0.01$). The use of *K. centauroides* reduced the MDA concentration by 27% ($p \leq 0.05$) and exerted a positive effect on the antioxidant system by stimulating the activities of SOD (1.2 times; $p \leq 0.05$) and GR (1.4 times; $p \leq 0.05$) in brain homogenate.

Conclusion. The *K. centauroides* dry extract used at a dose of 100 mg/kg during long-term alcohol intoxication normalizes energy processes, inhibits free-radical oxidative reactions and the production of reactive oxygen species (ROS), and enhances the endogenous antioxidant defense in the brain.

Keywords: *Klasea centauroides* (L.) dry extract; long-term alcohol intoxication; oxidative phosphorylation; brain; white rats

For citation: Markova K.V., Toropova A.A., Razuvaeva Ya.G., Olennikov D.N. The neuroprotective effect of *Klasea centauroides* (L.) Cassini dry extract in long-term alcohol intoxication. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2024; 68(3): 68-74. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.68-74

Author's contribution: concept and design of the study – Razuvaeva Ya.G., Olennikov D.N.; collection and processing of material – Toropova A.A., Markova K.V.; writing the text – Markova K.V.; editing the text – Razuvaeva Ya.G. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Kristina V. Markova*, senior research, Institute of General and experimental biology SB RAS, e-mail: kristen_kartland@mail.ru

Information about the authors:

Markova K.V., <https://orcid.org/0000-0002-2143-6925>

Toropova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2618-7777>

Razuvaeva Ya.G., <https://orcid.org/0000-0001-7829-1424>

Olennikov D.N., <https://orcid.org/0000-0001-8194-1061>

Financing. The research was carried out as part of the state assignment topic for the project FWSM-2021-0005 (state registration number 121030100227-7).

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

Received 15.02.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Длительное употребление этанола нарушает энергетические процессы в клетках различных органов, стимулирует выработку свободных радикалов и провоспалительных цитокинов, снижает эндогенную антиоксидантную защиту клеток [1, 2], что вызывает изменения в структуре тканей органов и их функциях,

в первую очередь нервной системы [1]. Нарушения функционирования нервной системы при алкогольной интоксикации проявляются парестезиями, симптомами тревоги и депрессии, нарушением процессов мышления и запоминания, а в тяжелых случаях – алкогольной энцефалопатией [3, 4].

Для восстановления адекватной работы нервной системы требуется длительный курс приема лекарственных препаратов. Для продолжительной терапии предпочтительнее использовать средства, созданные на растительной основе, поскольку они нетоксичны, практически не вызывают побочных эффектов и способны оказывать положительное влияние на организм в целом [5].

Одним из таких растений является *Klasea centauroides* (др. название – *Serratula centauroides* (L.)) – многолетнее, относится к семейству *Asteraceae*, имеющее в своем составе большое количество соединений, в том числе экидистероидов, фенольных соединений, аминокислот, полисахаридов и др., обладающих физиологической активностью [6]. Данное растение в течение многих лет используется в народной и традиционной медицине Сибири, Кореи, Китая и Монголии как противосудорожное, а также повышающее устойчивость к психическим и физическим нагрузкам лекарственное средство. Данное растение также нашло широкое применение при терапии повышенной нервной возбудимости, бессоннице, иммунодефицитных состояниях и заболеваниях желудочно-кишечного тракта [6]. По данным [7–9], экстракт сухой *K. centauroides* способен стимулировать когнитивные функции и поведенческую активность животных, а также проявляет нейропротективное влияние в условиях эксперимента при гипоксии, ишемии, а также при моделировании болезни Альцгеймера. **Цель исследования** – оценить влияние экстракта сухого *Klasea centauroides* на энергетические и антиоксидантные процессы в головном мозге в условиях длительной алкогольной интоксикации.

Методика

Опыты проведены на 32 крысах линии Wistar массой 180–200 г, полученных из ФГБНУ «Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований» (г. Ангарск). Животных содержали в стандартных условиях сертифицированного вивария ИОЭБ СО РАН, по восемь животных в клетке, со свободным доступом к воде и пище, в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) и Постановлением Правительства РФ N 855 от 13 июня 2020 г. Все экспериментальные работы осуществлялись согласно правилам, принятым в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.).

Количественную стандартизацию исследуемого экстракта сухого *Klasea centauroides* проводили с помощью метода высокоэффективной хроматографии с УФ-детектированием, определяя содержание 20-гидроксиэкидизона. Содержание 20-гидроксиэкидизо-

на в экстракте сухом *K. centauroides* составило не менее 2%. В качестве препарата сравнения был выбран экстракт *G. biloba* (препарат сравнения Танакан, ПН011709/01, «БофурИпсенИндастри», Франция).

Перед началом эксперимента, животные были случайным образом разделены на четыре группы (n=8): интактная, контрольная и две опытных. В течение 6 недель крысы контрольной и опытных групп получали этиловый спирт, разведенный до 40% дистиллированной водой, в дозе 10 мл/кг. Начиная с 15-х сут эксперимента, животным первой опытной группы внутривенно вводили водный раствор экстракта сухого *K. centauroides* в дозе 100 мг/кг, второй опытной группе экстракт *G. biloba* в аналогичной дозе на протяжении 4-х недель. Контрольная группа животных получала эквивалентное количество дистиллированной воды. Для проведения биохимических исследований животных декапитировали на 45-е сут эксперимента под эфирным наркозом.

Степень нарушения энергетических процессов в головном мозге определяли по активности митохондриальных ферментов комплекса I (NADH-дегидрогеназный) и комплекса II (сукцинат-дегидрогеназный комплекс (SDH комплекс)) [10, 11]. По концентрации малонового диальдегида (МДА) оценивали процессы свободнорадикального окисления в клетках головного мозга согласно [12]. Для получения данных о работе эндогенной антиоксидантной системы головного мозга определяли активность таких ферментов, как каталаза (CAT) [13], супероксиддисмутазы (SOD) [14], глутатионпероксидазы (GPx) [15] и глутатионредуктазы (GR) [15], а также измеряли содержание восстановленного глутатиона (GSH) [16].

Статистический анализ данных был проведен с использованием пакета программ Statistica for Windows 6.0. Предварительно была проверена оценка нормального распределения анализируемых показателей с помощью критерия Шапиро–Уилка. Различия между указанными показателями животных в интактной, контрольной и опытных группах были оценены с использованием критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при достижении значения $p \leq 0,05$.

Результаты

В ходе исследования выявлено, что при интоксикации этанолом нарушаются процессы в дыхательной цепи митохондрий головного мозга, о чем свидетельствует снижение активности комплекса I и комплекса II у контрольных животных в 1,5 и 1,9 раза по сравнению с таковыми у интактных животных (рис. 1). На фоне снижения энергетических процессов происходит ин-

тенсификация реакций свободнорадикального окисления липидов и торможение функционирования антиоксидантной системы, что выражается в повышении содержания МДА (в 1,7 раза) (рис. 2), в снижении активности САТ (на 13%), SOD (на 28%) (рис. 3), а также в нарушении работы глутатионового звена (рис. 4) относительно интактных показателей.

Активность комплекса I на фоне введения экстракта *K. centauroides* и препарата сравнения увели-

чивалась в 1,6 раза относительно такового в контроле, активность комплекса II в первой опытной группе повышался в 1,5 раза, тогда как во второй опытной группе – статистически не отличался от контрольного значения (рис. 1).

Применение экстракта *K. centauroides* оказывало ингибирующее воздействие на процессы свободнорадикального окисления липидов и способствовало повышению защиты антиоксидантной системы кле-

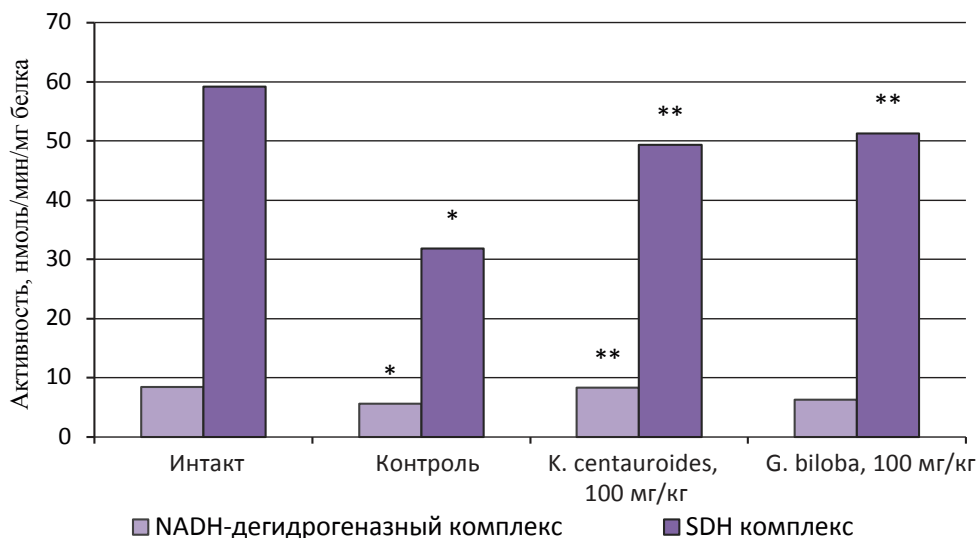


Рис. 1. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий в головном мозге белых крыс при длительной алкогольной интоксикации.

* – различия статистически значимы в сравнении с интактной группой при $p \leq 0,01$; ** – различия статистически значимы в сравнении с контрольной группой при $p \leq 0,01$.

Fig. 1. Activity of mitochondrial respiratory chain complexes in the brain of white rats during long-term alcohol intoxication.

* – differences are statistically significant in comparison with the intact group at $p \leq 0.01$; ** – differences are statistically significant in comparison with the control group at $p \leq 0.01$.

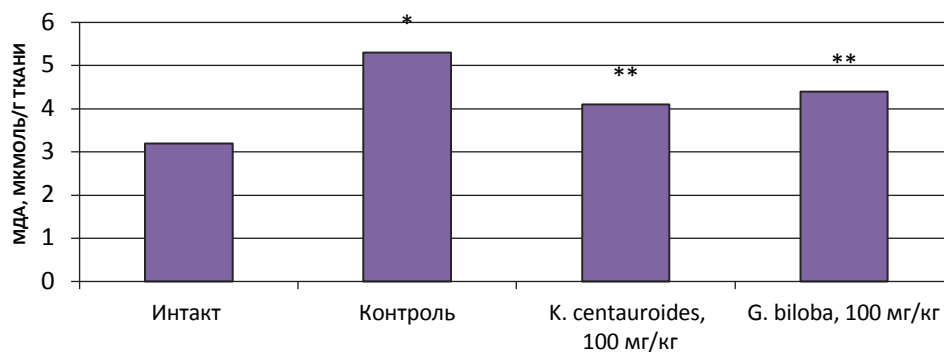


Рис. 2. Содержание малонового диальдегида в головном мозге белых крыс при длительной алкогольной интоксикации.

* – различия статистически значимы по отношению к интакту ($p \leq 0,01$); ** – различия статистически значимы по отношению к контролю при ($p \leq 0,05$).

Fig. 2. Malondialdehyde content in the brain of a white rat during long-term alcohol intoxication.

* – statistical characteristics are determined in relation to intact ($p < 0.01$); ** – difference in statistical indicators for control applications at ($p < 0.05$).

ток головного мозга лабораторных животных. Так, на фоне введения экстракта *K. centauroides* и препарата сравнения наблюдалось снижение концентрации МДА в гомогенате головного мозга соответственно на 27% и 22% относительно контрольного значения. Показатель активности SOD в обеих опытных группах увеличился в среднем в 1,3 раза, тогда как повышение активности CAT отмечалось только в первой опытной группе и составило 10% (рис. 3). Введение *K. centauroides* и препарата сравнения нормализовало работу глутатионовой системы: у крыс первой опытной группы активности ферментов GPX и GR увеличи-

вались на 13% и 37% соответственно, а содержание GSH – на 11% в сравнении с результатами контрольных животных (рис. 4). Во второй опытной группе активность GR была выше на 29%, тогда как GPX и уровень GSH только на 16% относительно контрольных параметров.

Токсическое воздействие алкоголя приводит к постепенному повреждению структуры мембран нейронов, нарушению их транспортной функции [1], блокирует ферментативные системы, способствующие прохождению глюкозы в клетки, что приводит к гипогликемии головного мозга и, следовательно, угне-

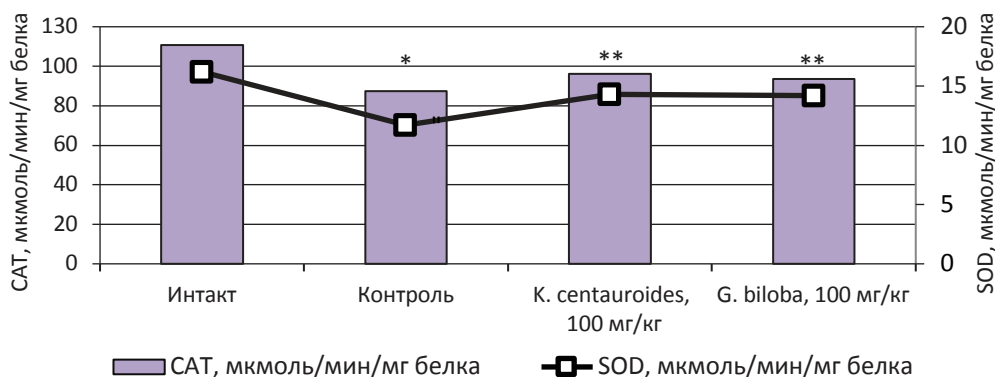


Рис. 3. Показатели активности CAT и SOD в головном мозге белых крыс при длительной алкогольной интоксикации.

* – различия статистически значимы по отношению к интакту ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по отношению к контролю ($p \leq 0,05$).

Fig. 3. Indicators of CAT and SOD activity in the brain of white rats during long-term alcohol intoxication.

* – differences are statistically significant in relation to intact ($p \leq 0.05$); ** – differences are statistically significant compared to control ($p \leq 0.05$).

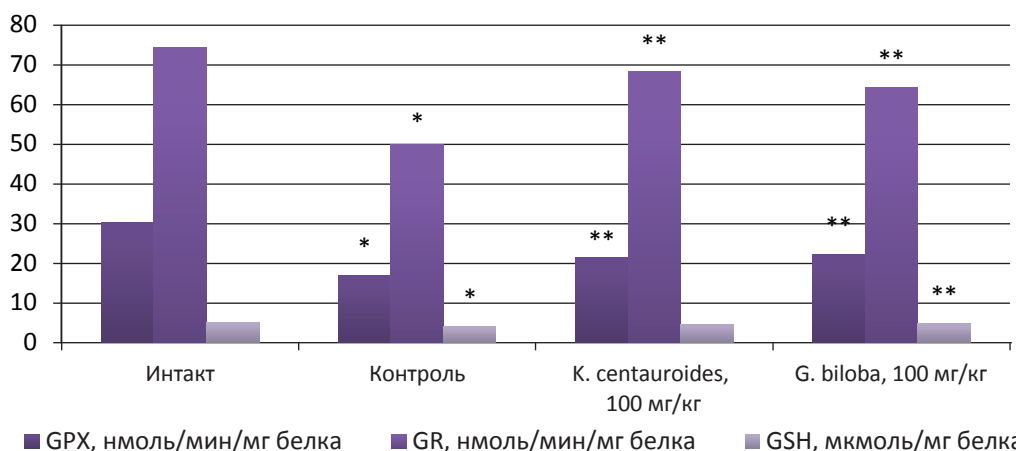


Рис. 4. Показатели активности глутатионового звена антиоксидантной системы в головном мозге белых крыс при длительной алкогольной интоксикации.

* – различия статистически значимы по отношению к интакту ($p \leq 0,01$); ** – различия статистически значимы по отношению к контролю ($p \leq 0,05$).

Fig. 4. Indicators of the activity of the glutathione unit of the antioxidant system in the brain of white rats during long-term alcohol intoxication.

* – differences are statistically significant in relation to intact ($p \leq 0.01$); ** – differences are statistically significant in relation to control ($p \leq 0.05$).

тению энергетических и антиоксидантных процессов [2]. Кроме того, при интоксикации этанолом активируется выработка свободных радикалов, NO, воспалительных цитокинов, снижается уровень ГАМК, в следствие чего повышается риск развития нейродегенеративных процессов в головном мозге [1].

Применение экстракта сухого *K. centauroides* на фоне длительного приема этанола корригирует энергетические процессы в головном мозге, усиливая работу комплекса I и комплекса II в митохондриях нейронов головного мозга, восстанавливает работу антиоксидантной системы, стимулируя активность таких ферментов, как CAT, GR, GPx, и повышая уровень GSH в головном мозге, а также тормозит процессы свободнорадикального окисления, уменьшая содержание МДА. Выявленные в ходе эксперимента эффекты исследуемого экстракта связаны с действием биологически активных веществ, входящих в химический состав *K. centauroides*. Так, экидистероиды, присутствующие в значительном количестве, улучшают работу нервных клеток за счет индукции глутаматдекарбоксилазы, оказывающей влияние на биосинтез ГАМК, а 20-гидроксиэкидизон, снижает избыточный уровень стресс-медиаторов [17]. Кверцетин, лютеолин, апигенин – флавоноиды, содержащиеся в *K. centauroides* обладают способностью останавливать развитие патологических процессов в ткани головного мозга, снижать выработку свободных радикалов и предотвращать возникновение воспалительного процесса в нервной ткани [18]. В составе *K. centauroides* имеются фенилпропаноиды, среди которых наиболее значимым нейропротективным действием обладает 5-О-кофеилхинная кислота, так как имеет выраженные антиоксидантные и противовоспалительные свойства, таким образом, предотвращая развитие сосудистых и нейродегенеративных заболеваний [19]. Кроме вышеперечисленных метаболитов, в исследуемом экстракте присутствуют полисахариды, угнетающие развитие окислительного стресса, снижая концентрацию МДА, а также оказывают антиоксидантное действие, увеличивая активность GPx и содержание GSH, способствуют снижению АФК и цитокинов [20].

Заключение

K. centauroides экстракт сухой в дозе 100 мг/кг на фоне длительной алкогольной интоксикации восстанавливает работу дыхательной цепи митохондрий, повышая активность комплексов I и II, тормозит процессы свободнорадикального окисления, снижая концентрацию МДА, а также улучшает работу эндогенной антиоксидантной системы головного мозга.

Литература

(п.п. 2; 4; 5; 8-11; 15-20 см. References)

1. Зиновьева О.Е., Вашенко Н.В., Мозговая О.Е., Янакаева Т.А., Емельянова А.Ю. Поражение нервной системы при алкогольной болезни. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2019; 11: 83-8. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2019-2S-83-88>
3. Мироненко Т.В., Чумак Е.В., Лозовой Е.В. Неврологические синдромы хронического алкоголизма. *Международный неврологический журнал*. 2010; 6(36): 166-73.
6. Николаева И.Г., Цыбиктарова Л.П., Гармаева Л.Л., Николаева Г.Г., Оленников Д.Н., Матханов И.Э. Определение содержания экидистероидов в сырье *Rhaponticum uniflorum* и *Serratula centauroides* методом хроматоспектрофотометрии. *Журнал аналитической химии*. 2017; 72(8): 733-41. <https://doi.org/10.7868/S0044450217080047>
7. Маркова К.В., Торопова А.А., Разуваева Я.Г., Оленников Д.Н. Исследование противоишемического действия экстрактов сухих *Rhaponticum uniflorum* и *Serratula centauroides* на модели билатеральной окклюзии сонных артерий. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022; 7(1): 28-36. <https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.1.4>
12. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике*. М.: МЕДпресс-информ; 2009.
13. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-9.
14. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985; 11: 678-81.

References

1. Zinov'eva O.E., Vashhenko N.V., Mozgovaja O.E., Janakaeva T.A., Emel'janova A.Ju. Damage to the nervous system due to alcoholism. *Neurologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika*. 2019; 11: 83-8. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2019-2S-83-88> (In Russian)
2. Chopra K., Tiwari V. Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012; 73: 348-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04111.x>
3. Mironenko T.V., Chumak E.V., Lozovoj E.V. Neurological syndromes of chronic alcoholism. *Mezhdunarodnyy nevrologicheskij zhurnal*. 2010; 6(36): 166-73. (In Russian)
4. Swift R.M., Aston E.R. Pharmacotherapy for alcohol use disorder: Current and emerging therapies. *Harvard Review of Psychiatry*. 2015; 23(2): 122-33. <https://doi.org/10.1097/HRP.000000000000079>
5. Amirzargar N., Heidari-Soureshjani S., Yang Q., Abbaszadeh S., Khaksarian M. Neuroprotective effects of medicinal plants in cerebral hypoxia and anoxia: A systematic review. *The Natural Products Journal*. 2020; 10(5): 550-65. <https://doi.org/10.2174/2210315509666190820103658>
6. Nikolaeva I.G., Cybiktarova L.P., Garmayeva L.L., Nikolaeva G.G., Olennikov D.N., Mathanov I.Je. Determination of the content of ecdysteroids in raw materials of *Rhaponticum uniflorum* and *Serratula centauroides* by chromatospetrophotometry. *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2017; 72(8): 733-41. (In Russian)
7. Markova K.V., Toropova A.A., Razuvaeva Ja.G., Olennikov D.N. Study of the antiischemic effect of *Rhaponticum uniflorum* and *Serratula centauroides* dry extracts on a model of bilateral occlusion of

- the carotid arteries. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022; 7(1): 28-36. (In Russian). <https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.1.4>
8. Торопова А.А., Razuvaeva Y.G., Olennikov D.N., Markova K.V., Lemza S.V. Protective effects of *Leuzea uniflora* (*Rhaponticum uniflorum*) on the brain mitochondrial function in white rats at hypoxia/reoxygenation. *Natural Product Research*. 2022; 36: 36495287. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2155646>
 9. Razuvaeva Y.G., Markova K.V., Toropova A.A., Olennikov D.N. Effect of the extract of dry *Serratula centauroides* on the behavior of white rats in tests with positive reinforcement. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2021; 19(2): 237-42. <https://doi.org/10.17816/RCF192237-242>
 10. Pollard A.K., Craig E.L., Chacrabarti L. Mitochondrial Complex I activity measured by spectrophotometry is reduced across all brain regions in ageing and more specifically in neurodegeneration. *PLOS One*. 2016; 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157405>
 11. Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature protocols*. 2021; 27(6): 1235-46. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>
 12. Kamyshnikov V.S. *Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics. [Spravochnik po kliniko-biokhimicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike]*. Moscow: MEDpress-in-form, 2009. (In Russian)
 13. Koroljuk M.A. Method for determining catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; (1): 16-9. (In Russian)
 14. Chevari S., Chaba I., Sekej J. The role of superoxide dismutase in the oxidative processes of the cell and the method for its determination in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; 11: 678 - 81. (In Russian)
 15. Pinto R.E., Bartley W. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemical Journal*. 1969; 112(1): 109-15. <https://doi.org/10.1042/bj1120109>
 16. Shaik I.H., Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: Application to the rat liver and bile samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006; 385(1): 105-13. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0375-8>
 17. Kholodova Iu.D., Tugai V.A., Zimina V.P. Effect of vitamin D3 and 20-hydroxyecdysone on the content of ATP, creatine phosphate, carnosine and Ca²⁺ in skeletal muscles. *Ukrainskiy Biokhimicheskiy Zhurnal*. 1997; 69: 3-9.
 18. Rendeiro C., Rhodes J.S., Spencer J.P.E. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochemistry International*. 2015; 89: 126-39. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.002>
 19. Lu H., Tian Z., Cui Y., Liu Z., Ma X. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2020; 19(6): 3130-58. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12620>
 20. Yuan Q., Yuan Y., Zheng Y., Sheng R., Liu L., Xie F., et al. Anti-cerebral ischemia reperfusion injury of polysaccharides: A review of the mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 137: 111303. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111303>

Сведения об авторах:

Маркова Кристина Владимировна, канд. мед. наук, мл. науч. сотр., лаб. безопасности биологически активных веществ, e-mail: kristen_kartland@mail.ru;

Торопова Анюта Алексеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. безопасности биологически активных веществ;

Разуваева Янина Геннадьевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. безопасности биологически активных веществ;

Оленников Даниил Николаевич, доктор фарм. наук, зав. лаб. медико-биологических исследований.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 615.015:615.244:615.322

Бабенко А.Н., Крепкова Л.В., Лемясева С.В., Кузина О.С., Боровкова М.В.**Гепатопротекторное действие цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) при интоксикации крыс сулемой**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,
117216, Москва, Россия, ул. Грина, д. 7

Химическое загрязнение среды обитания создает серьезную угрозу здоровью населения, приводит к росту заболеваемости, в том числе к увеличению заболеваний гепатобилиарной системы. Заболевания печени, тяжесть их течения требуют комплексного решения указанной проблемы и создания новых эффективных лекарственных средств. Особое внимание уделяется лекарственным препаратам растительного происхождения, обладающим комплексным профилактическим и терапевтическим потенциалом. **Цель исследования** – оценка гепатопротекторного действия цикория обыкновенного травы экстракта сухого (ЦОТЭС) на модели острой сулемовой интоксикации крыс.

Методика. Исследование выполнено на самцах крыс Wistar. Модель острого токсического поражения печени вызывали однократным подкожным введением сулемы в дозе 3 мг/кг. ЦОТЭС вводили в желудок крысам за 1 ч до инъекции сулемы и в последующие 20 дней в дозах 100 и 500 мг/кг. Гепатопротектор Силимар® вводили по той же схеме в терапевтической дозе 100 мг/кг. На 21 день опыта регистрировали интегральные показатели здоровья экспериментальных животных, брали пробы периферической крови для определения биохимических показателей. В конце эксперимента проводили патогистологические исследования печени крыс. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью лицензионной программы Statistica version 13 (TIBCO Software Inc, США).

Результаты. Исследование на крысах с экспериментальной моделью острой интоксикации печени сулемой показало, что исследуемый экстракт проявлял гепатопротекторное действие в дозах 100 и 500 мг/кг, снижая их гибель и токсическое действие на печень, нормализуя биохимические и морфологические показатели. По степени выраженности гепатозащитного действия на указанной модели патологии печени ЦОТЭС в указанных дозах соответствовал силимару, широко применяемому в настоящее время в медицинской практике гепатопротектору.

Заключение. Исследование впервые раскрыло новые аспекты фармакологической активности ЦОТЭС, которые проявлялись в его антиоксидантном действии. Результаты исследования послужили основанием для создания на основе изученного экстракта нового лекарственного препарата для лечения заболеваний печени различной этиологии, в том числе, вызванных интоксикацией солями тяжелых металлов.

Ключевые слова: *Cichorium intybus* L.; сухой экстракт; модель острой интоксикации крыс; хлорид ртути (II).

Для цитирования: Бабенко А.Н., Крепкова Л.В., Лемясева С.В., Кузина О.С., Боровкова М.В. Гепатопротекторное действие цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) при интоксикации крыс сулемой. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 75-84.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.75-84

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Бабенко А.Н., Крепкова Л.В.; сбор и статистическая обработка материала – Бабенко А.Н., Крепкова Л.В., Лемясева С.В., Боровкова М.В., Кузина О.С.; подготовка иллюстративного материала – Бабенко А.Н., Крепкова Л.В. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Бабенко Александра Николаевна, e-mail: alexandra.mogileva@gmail.com

Финансирование. Исследования выполнены по теме «Направленный скрининг, оценка фармакологической активности и безопасности биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе» (шифр темы FGUU-2022-0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.04.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Babenko A.N., Krepkova L.V., Lemyaseva S.V., Kuzina O.S., Borovkova M.V.

Hepatoprotective effect of chicory (*Cichorium intybus* L.) in rat intoxication with mercury (II) chloride

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

Chemical pollution of the environment poses a serious threat to public health, leads to an increase in morbidity, including an increase in diseases of the hepatobiliary system. Liver diseases and the severity of their course require a comprehensive solution to this problem and the creation of new effective medicines. Special attention is paid to herbal medicines with comprehensive preventive and therapeutic potential. **The aim** of the study was to evaluate the hepatoprotective effect of the dry extract of aerial part of chicory on a model of acute intoxication in rats with mercury (II) chloride.

Methods. The study was performed on male Wistar rats. A model of acute toxic liver damage was caused by a single subcutaneous injection of mercury (II) chloride at a dose of 3 mg / kg. The dry extract of chicory was administered into the stomach of rats 1 hour before injection of mercury (II) chloride and in the following 20 days at doses of 100 and 500 mg / kg. The hepatoprotector Silimar® was administered according to the same scheme at a therapeutic dose of 100 mg /kg. On the 21st day of the experiment, integral health indicators of experimental animals were recorded, peripheral blood samples were taken to determine biochemical parameters. At the end of the experiment, pathohistological studies of the rat liver were performed. Statistical processing of the obtained results was carried out using the licensed program Statistica version 13 (TIBCO Software Inc, USA).

Results. A study on rats with an experimental model of acute liver intoxication with mercury (II) chloride showed that the studied extract showed hepatoprotective effect at doses of 100 and 500 mg/kg, reducing their death and toxic effect on the liver, normalizing biochemical and morphological parameters. According to the degree of severity of the hepatoprotective effect on the specified model of liver pathology, the dry extract of chicory in these doses corresponded to Silimar®, a hepatoprotector currently widely used in medical practice.

Conclusion. The study revealed for the first time new aspects of the pharmacological activity of the dry extract of chicory, which were manifested in its antitoxic effect. The results of the study served as the basis for the creation of a new medicine based on the studied extract for the treatment of liver diseases of various etiologies, including those caused by intoxication with heavy metal salts.

Keywords: *Cichorium intybus* L.; dry extract; rat acute intoxication model; mercury (II) chloride

For citation: Babenko A.N., Krepkova L.V., Lemyaseva S.V., Kuzina O.S., Borovkova M.V. Hepatoprotective effect of chicory (*Cichorium intybus* L.) in rat intoxication with mercury (II) chloride. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 75-84. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.75-84

Author's contribution: Babenko A.N., Krepkova L.V. – the concept and design of the study, writing the text; Babenko A.N., Krepkova L.V., Lemyaseva S.V., Borovkova M.V., Kuzina O.S. – collection and statistical processing of the material; Babenko A.N. Krepkova L.V. – preparation of illustrative material; Babenko A.N., Krepkova L.V., Lemyaseva S.V., Borovkova M.V., Kuzina O.S. – approval of the final version of the article.

For correspondence: **Alexandra N. Babenko**, Ph.D. (Biol) senior researcher at the department of toxicology, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russian Federation, e-mail: alexandra.mogileva@gmail.com

Information about the authors:

Babenko A.N., <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>

Krepkova L.V., <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>

Lemyaseva S.V., <https://orcid.org/0000-0003-0369-2842>

Kuzina O.S., <https://orcid.org/0000-0001-8787-8390>

Borovkova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3568-6407>

Financing. The studies were carried out on the topic "Targeted screening, evaluation of pharmacological activity and safety of biologically active substances and pharmaceutical compositions based on them" (topic code FGUU-2022-0010).

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

Received 15.04.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

В настоящее время развитие химической промышленности, внедрение новых технологий во многие отрасли народного хозяйства и в сферу быта, сопровождается химическим загрязнением среды обитания,

создает серьезную угрозу здоровью населения, что приводит к росту заболеваемости, в том числе к увеличению заболеваний гепатобилиарной системы и ухудшению качества жизни населения [1, 2]. К таким хи-

мическим веществам относятся химические добавки к пищевым продуктам, лекарственные средства, ядохимикаты (инсектициды, пестициды, гербициды), препараты бытового назначения (краски, лаки, растворители, синтетические моющие средства), тиоловые яды – ртуть, свинец, мышьяк, кадмий и другое [3–7].

Установлено, что доля факторов окружающей среды в возникновении заболеваний гепатобилиарной системы может составлять от 14 до 36%. Так, у населения, проживающего в экологически неблагополучных районах, вероятность появления заболеваний печени в 3–4 раза выше, чем у населения, проживающего на экологически безопасных территориях [8].

Заболевания печени, тяжесть их течения требуют комплексного решения указанной проблемы и обуславливают её актуальность. Среди медикаментозных средств лечения патологии печени особое внимание уделяется лекарственным препаратам, обладающим комплексным профилактическим и терапевтическим потенциалом, позволяющим снизить риск их возникновения и осуществить эффективную терапию. К таким средствам относятся препараты природного происхождения, в том числе, созданные на основе лекарственного растительного сырья, которые используются для этих целей во всем мире. В последние годы они приобрели большое значение и популярность благодаря своей безопасности, эффективности и экономичности [9–14].

Большинство применяющихся в настоящее время в медицинской практике растительных лекарственных средств в своем составе содержат разнообразные химические вещества, такие как флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные и органические кислоты и другие, для которых характерно наличие антиоксидантных, гепатопротекторных, гиполлипидемических, иммуномодулирующих, гипогликемических, антибактериальных, противовоспалительных свойств. Это обуславливает их высокую терапевтическую эффективность при лечении заболеваний печени, включая токсические гепатиты [10–17]. Перспективным лекарственным сырьем для создания таких лекарственных средств является цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) семейства Астровые (Asteraceae), биологически активные вещества которого обуславливают широкий спектр его фармакологической активности [18–23]. В ФГБНУ ВИЛАР из травы цикория обыкновенного получен сухой экстракт, который в экспериментах *in vitro* и *in vivo* проявлял антиоксидантные, иммуномодулирующие, гиполлипидемические и гепатопротекторные свойства [24–27], однако его применение для восстановления функций печени при острых инток-

сикациях тяжелыми металлами, в том числе ртутью, изучено не было. **Цель исследования** – изучение гепатопротекторного действия цикория обыкновенного травы экстракта сухого (ЦОТЭС) на модели острой сулемовой интоксикации крыс для создания на основе изученного экстракта лекарственного препарата.

Методика

Очищенный сухой экстракт получен из травы цикория обыкновенного, собранной в Рязанской области в 2019 г. Экстракцию проводили 70% этанолом при температуре $50 \pm 5^\circ\text{C}$ при постоянном перемешивании. Лиофильные соединения очищали путем обработки концентрированного экстракта дихлорэтаном (Chemical Point UG, Германия). Полученный экстракт стандартизировали по сумме фенольных соединений, количество которых составило $(9,20 \pm 0,46)\%$, в пересчете на цикориевую кислоту [24]. В ЦОТЭС идентифицированы основные действующие вещества: гидроксикоричные кислоты (цикориевая – $(2,90 \pm 0,09)\%$, хлорогеновая – $(1,77 \pm 0,06)\%$, кафтаровая – $(0,20 \pm 0,01)\%$) и оксикумарины (цикорин – $(1,44 \pm 0,05)\%$, эскулетин – $(0,44 \pm 0,14)\%$) [24].

Исследования выполнены на 70 крысах Wistar (самцы), масса тела 180–200 г в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012). Содержание, кормление и уход за животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123) (Страсбург, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. План исследования был одобрен Комиссией по биоэтике Института (Протокол № 27 от 18.05.2020 г.).

Модель острого токсического поражения печени крыс вызывали однократным подкожным введением сулемы в дозе 3 мг/кг [13]. При остром отравлении солями тяжелых металлов клиническая картина характеризуется преимущественно признаками поражения печени с типичными проявлениями токсического гепатита. При воздействии ртути и её неорганических соединений, в том числе сулемы, острая интоксикация развивается быстро, а патогенез повреждения связан с блокадой функционально активных сульфгидрильных (SH) групп ферментов. Гепатотоксическое действие сулемы вызывает изменения биохимических показателей крови, а именно увеличение активности «печеночных» ферментов (аланин- и аспартаттрансаминазы, щелочная фосфатаза), нарушение липидного, белкового и минераль-

ного обменов, что приводит к функциональным нарушениям печени, ее паренхимы. Под действием сулемы формируются выраженные гистологические изменения гепатоцитов, что приводит к гибели клеток посредством как апоптоза, так и аутофагии [28, 29].

Экспериментальные животные были разделены на 5 групп случайно по 14 крыс в каждой: I группа – интактный контроль, используемый для оценки токсического действия сулемы; животным II группы (модель патологии) однократно вводили подкожно (п/к) сулему в дозе 3 мг/кг; III и IV группы за 1 час до введения сулемы и в последующие 20 дней получали в желудок ЦОТ-ЭС в виде водных растворов в дозах 100 и 500 мг/кг; V группа за 1 час до введения сулемы и в последующие 20 дней получала в желудок отечественный растительный гепатопротектор Силимар® (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) в терапевтической дозе 100 мг/кг.

На протяжении эксперимента регистрировали основные интегральные показатели экспериментальных животных: общее состояние, поведение, динамику массы тела, гибель. На 21-е сут опыта определяли показатели клинической биохимии сыворотки крови: общий белок, общий холестерин, триглицериды, глюкоза, общий билирубин, активность аланин- и аспартатаминотрансфераз (АЛТ, АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) на автоматическом биохимическом анализаторе крови URIT-8030 фирмы Urit Medical Electronic (Китай), при помощи наборов фирмы Human, Германия. В конце эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии в CO₂ – камере, у них определяли коэффициенты массы печени с ее патогистологической оценкой при окра-

шивании срезов гематоксилином и эозином и исследовании световой микроскопией при увеличении ×100.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью лицензионной программы Statistica version 13 (TIBCO Software Inc, США). Предварительно оценивали характер распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, который показал, что данный цифровой материал подчиняется закону нормального распределения. Результаты выражены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего (M, SEM). Статистический анализ различий между группами проводили с использованием дисперсионного анализа для связанных групп – repeated measures ANOVA. Во всех случаях различия принимали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Введение сулемы крысам II группы вызывало нарушение общего состояния животных: у них наблюдали гиподинамию, снижение динамики массы тела на 15% в течение первых 10 дней и гибель 2 (14%) крыс в группе. Под влиянием сулемы развивалось токсическое повреждение печени, характерное для острого отравления крыс этим гепатотропным ядом, нарушение ее функционального состояния, которое характеризовалось статистически значимым увеличением в сыворотке крови крыс уровня общего белка, глюкозы, общего холестерина, триглицеридов и активности индикаторных и экскреторных ферментов печени: АЛТ и АСТ, ЩФ, ГГТ (табл. 1). У животных этой группы отмечали увеличение массы печени и гиалиново-капельную дистрофию гепатоцитов (рис. 1).

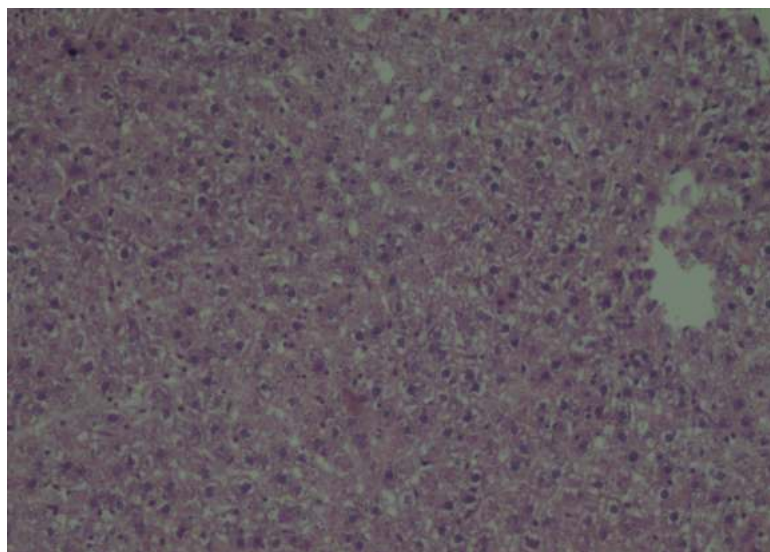


Рис. 1. Морфологическая картина печени крыс при интоксикации сулемой. Окраска гематоксилином и эозином, ×100.

Fig. 1. Morphological structure of rat liver in case of intoxication with mercury (II) chloride. Staining with hematoxylin/eosin, ×100.

20-дневное введение ЦОТЭС в желудок крысам в обеих испытанных дозах улучшало общее состояние животных, их внешний вид, снижало гибель до 7%, повышало их двигательную активность, способствовало сохранению массы тела (снижение исследуемого показателя составило 8-11% по сравнению с контролем) (рис. 2).

У крыс, получавших на фоне острой интоксикации сулемой ЦОТЭС в дозах 100 и 500 мг/кг, отмечали нормализацию биохимических показателей сыворотки крови, характеризующих белковый, липидный и углеводный обмен в печени, которые к концу эксперимента соответствовали аналогичным показателям в контроле (табл. 1).

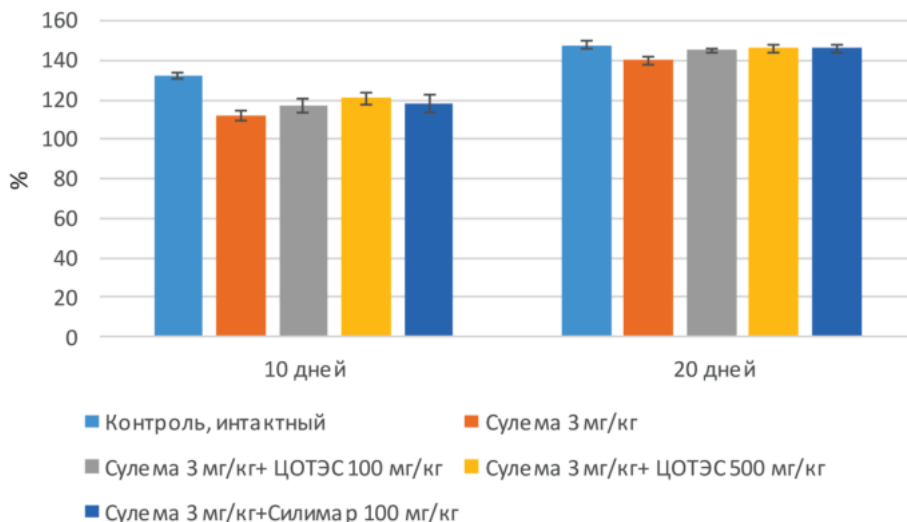


Рис. 2. Динамика массы тела крыс (в % к исходной), получавших ЦОТЭС (M+ m).

Fig. 2. Dynamics of body weight of rats (in % of baseline) treated with the dry extract of chicory (M+m).

Таблица 1/ Table 1

Биохимические показатели крови крыс-самцов, сулемовая модель (M±m)

Biochemical blood parameters of male rats, mercury (II) chloride model (M±m)

Группа животных Animal Group (n=10)	Общий белок, г/л Total protein, (g/l)	Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, (mmol/l)	Холестерин, общий, ммоль/л Cholesterol, total (mmol/l)	Билирубин, общий, мкмоль/л Bilirubin total, (μmol/l)	Глюкоза, ммоль/л Glucose, (mmol/l)
I. Контроль интактные Control Intact	74,7±1,0	0,98±0,11	1,72±0,04	4,9±0,2	7,04±0,17
II. Сулема, 3 мг/кг mercury (II) chloride, 3 mg/kg	83,7±1,1*	1,55±0,12*	2,80±0,08*	7,8±0,1*	9,01±0,16*
III. Сулема + ЦОТЭС, 100 мг/кг mercury (II) chloride+ chicory extract 100 mg/kg	75,3±0,7+	1,22±0,15+	2,12±0,08+	4,6±0,1+	7,24±0,14+
IV. Сулема + ЦОТЭС, 500 мг/кг mercury (II) chloride+ chicory extract 500 mg/kg	76,3±0,9+	1,16±0,15+	1,81±0,05+	4,8±0,1+	7,47±0,13+
V. Сулема + Силимар®, 100 мг/кг mercury (II) chloride+ Silimar® 100 mg/kg	75,3±1,1+	1,02±0,16+	1,89±0,07+	4,7±0,2+	7,42±0,18+

Примечание. * p<0,05 по сравнению с контрольной группой, + p<0,05 – относительно значений II группы в тот же срок наблюдения.

Note. * p<0.05 compared to the control group, + p<0.05 – relative to the values of group II at the same follow-up period.

Введение ЦОТЭС крыс III и IV групп в течение 20 дней предотвращало резкое повышение активности ферментов сыворотки крови, характеризующих функциональное состояние печени, и способствовало их более быстрой нормализации. Следует отметить, что статистически значимых различий между указанными показателями в этих группах выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 2).

Оценивая полученные результаты, можно утверждать, что введение ЦОТЭС в изученных дозах, вызывало у животных аналогичные изменения интегральных и биохимических показателей, в том числе активности ферментов сыворотки крови, что и у крыс, после введения Силимара в дозе 100 мг/кг, при этом статистически значимых различий между исследуемыми группами животных установлено не было ($p > 0,05$) (табл. 1, 2).

В условиях проведенного эксперимента под влиянием ЦОТЭС в обеих дозах статистически значимо снижалась относительная масса печени крыс по сравнению с аналогичным показателем у животных II группы (табл. 3).

Результаты патогистологического исследования печени не выявили дистрофических изменений в гепатоцитах у крыс, получавших исследуемый экстракт цикория в обеих исследуемых дозах, что подтверждает наличие у него выраженных гепатопротекторных свойств (рис. 3, 4).

Обсуждение

Результаты проведенного нами исследования показали, что в условиях острого токсического повреждения печени крыс сулемой, нарушается общее состояние животных, белковый, липидный и углеводный

Таблица 2/ Table 2

Показатели активности некоторых ферментов сыворотки крови крыс-самцов, сулемовая модель (M±m)

Activity indices of some enzymes in the blood serum of male rats, mercury (II) chloride model (M±m)

Группа животных Animal Group (n=10)	ГГТ, Е/л γ-glutamyl transferase, (U/L)	ЩФ, Е/л alkaline phosphatase (U/L)	АСТ, Е/л aspartate aminotransferase (U/L)	АЛТ, Е/л alanine aminotransferase (U/L)
I. Контроль интактные Control Intact	6,5±0,7	784,0±28,4	136,8±4,2	89,3±3,7
II. Сулема, 3 мг/кг, mercury (II) chloride, 3 mg/kg	11,0±0,4*	1005,1±44,2*	175,1±4,4*	126,3±4,1*
III. Сулема + ЦОТЭС, 100 мг/кг, mercury (II) chloride+ chicory extract 100 mg/kg	9,0±0,5 ⁺	971,0±60,4	154,7±10,5	90,0±5,4 ⁺
IV. Сулема + ЦОТЭС, 500 мг/кг mercury (II) chloride+ chicory extract 500 mg/kg	8,7±0,7 ⁺	897,6±57,0	151,1±7,1 ⁺	80,9±1,6 ⁺
V. Сулема + Силимар®, 100 мг/кг mercury (II) chloride+ Silimar®100 mg/kg	8,6±0,4 ⁺	819,7±64,7	142,3±5,8 ⁺	92,0±3,4 ⁺

Примечание. Примечания те же, что в табл. 1.

Note. The notes are the same as in table 1.

Таблица 3/ Table 3

Коэффициент массы печени крыс (масса органа в г на 100 г массы тела), получавших ЦОТЭС (M±m)

The liver mass coefficient of rats (organ mass in g per 100 g of body weight) treated with the dry extract of chicory (M±m)

I. Контроль интактный, Control Intact	II. Сулема, 3 мг/кг mercury (II) chloride, 3 mg/kg	III. Сулема + ЦОТЭС, 100 мг/кг mercury (II) chloride+ chicory extract 100 mg/kg	IV. Сулема + ЦОТЭС, 500 мг/кг mercury (II) chloride+ chicory extract 500 mg/kg	V. Сулема + Силимар®, 100 мг/кг mercury (II) chloride+ Silimar®100 mg/kg
3,93±0,13	5,12±0,15*	4,53±0,16 ⁺	4,16±0,06 ⁺	4,25±0,23 ⁺

Примечание. Примечания те же, что в табл. 1.

Note. The notes are the same as in table 1.

обмен в печени; увеличение показателей активности «печеночных» ферментов, сопровождается гепатомегалией и капельно-жировой дистрофией гепатоцитов. Введение ЦОТЭС в дозах 100 и 500 мг/кг в желудок крысам с острым повреждением печени сулемой

улучшало общее состояние животных, способствовало сохранению массы тела, повышало двигательную активность, снижало их гибель и токсическое действие на печень, нормализуя биохимические и морфологические показатели.

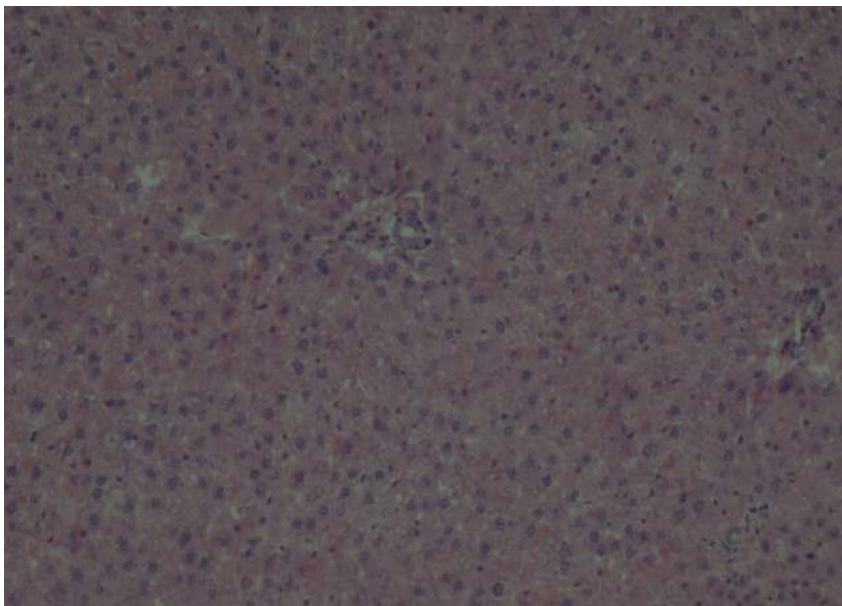


Рис. 3. Морфологическая картина печени крыс, получавших ЦОТЭС в дозе 100 мг/кг на фоне сулемы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$
Fig. 3. Morphological structure of the liver of rats treated with the dry extract of chicory at a dose of 100 mg/kg on the background of mercury (II) chloride. Staining with hematoxylin/eosin, $\times 100$.

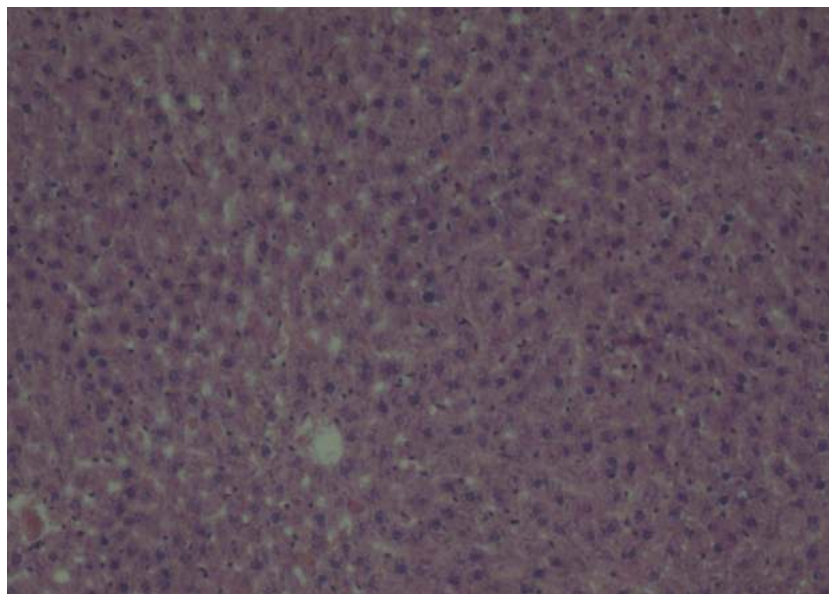


Рис. 4. Морфологическая картина печени крыс, получавших ЦОТЭС в дозе 500 мг/кг на фоне сулемы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.
Fig. 4. Morphological structure of the liver of rats treated with the dry extract of chicory at a dose of 500 mg/kg on the background of mercury (II) chloride. Staining with hematoxylin/eosin, $\times 100$.

Анализ литературы по теме исследования свидетельствует, что защитное действие цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) на печень объясняется наличием в нем комплекса биологически активных веществ, в том числе гидроксикоричных кислот (цикориевая, хлорогеновая, кафтаровая) и оксикумаринов (эскулетин и цикориин) [30-34]. Цикориевая кислота, являясь одним из основных компонентов экстракта, проявляет антиоксидантные и противовоспалительные свойства [30, 31].

Эскулетин также обладает огромным антиоксидантным потенциалом, ингибируя окислительный стресс при патологических состояниях и улучшая функциональное состояние печени. Эскулетин в опытах *in vitro* и *in vivo* ингибировал перекисное окисление липидов, вызванное усилением экспрессии, опосредованной TGF- β , и дисфункцией антиоксидантных ферментов, тем самым уменьшая фиброз печени за счет действия на сигнальный путь PI3K/FoxO1 [33].

Ra-Yeong Choi и соавт. в своей работе показали, что эскулетин защищал печень мышей с диабетом, индуцированным инъекцией стрептозотоцина, от развития неалкогольной жировой дистрофии посредством регуляции метаболизма липидов, глюкозы и процесса воспаления [35], а также фиброза [36]. В работе [37] доказано гепатопротекторное действие эскулетина с использованием культивируемых клеток — гепатоцитов крыс Wistar. Эскулетин значительно снижал окислительный стресс в гепатоцитах, обработанных пальмитиновой кислотой, о чем свидетельствовало снижение общего количества активных форм кислорода и выработка митохондриального супероксида, а также повышенная экспрессия генов антиоксидантов, включая Nrf2 и Gpx1; улучшал липидный обмен в гепатоцитах, защищал их от некроза.

Гепатопротекторное действие экстракта цикория, обусловленное ингибированием окислительного стресса и усилением антиоксидантного действия, подтверждено в исследовании L. Costea и соавт. [38]. Цикорий обыкновенный имеет широкое практическое применение в медицинской и пищевой промышленности. Семена цикория входят в состав хорошо известного многокомпонентного растительного лекарственного препарата (Liv-52), предлагаемого Himalaya Drug Company для лечения различных заболеваний печени [18].

Заключение

В целом, полученные нами экспериментальные данные о гепатопротекторном действии ЦОТЭС, согласуются с результатами ранее опубликованных исследований и свидетельствуют о перспективности

создания на основе исследуемого экстракта лекарственного препарата для лечения заболеваний печени различной этиологии, в том числе, вызванных интоксикацией солями тяжелых металлов.

Литература

(п.п. 5; 6; 9; 16-23; 26; 29-33; 35-38 см. References)

1. Елисеева А.В. Экологические проблемы регионов России и их влияние на демографическую ситуацию. *Инновационная экономика: материалы II Междунар. науч. конф.* 2015: Казань: Бук: 112-5. <https://moluch.ru/conf/econ/archive/170/8831>
2. Даукаев Р.А., Ларионова Т.К., Афонькина С.Р., Аллаярова Г.Р., Адиева Г.Ф., Печерская В.Л. и др. Изучение загрязнения тяжелыми металлами растительной продукции, выращенной на территории промышленного региона. *Медицина труда и экология человека.* 2018; 3: 22-7. URL <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-zagryazneniya-tyazhelyimi-metallami-rastitelnoy-produktsii-vyraschennoy-na-territorii-promyshlennogo-regiona> (дата обращения: 03.06.2024).
3. Логинов А.Ф., Буторова Л.И., Логинов В.А. Лекарственные поражения печени: диагностика, лечение. *РМЖ. Гастроэнтерология.* 2016; (11): 721-7.
4. Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Хлынова О.В., Алексеенко С.А., Арямкина О.Л., Бакулин И.Г. и др. Лекарственные поражения печени (ЛПП) у взрослых. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2020; 174(2): 29-54. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-174-2-29-54>
5. Антоненко О.М. Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции. *Медицинский Совет.* 2013; (6): 45-51. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2013-6-45-51>. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2013-6-45-51>
6. Сакиев К.З., Батырбекова Л.С. Влияние факторов окружающей среды на состояние гепатобилиарной системы населения, проживающего в экологически неблагоприятных регионах. *Медицина и экология.* 2015; 4(77): 8-15. URL <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-faktorov-okruzhayushey-sredy-na-sostoyanie-gepatobiliarnoy-sistemy-naseleniya-prozhivayuschego-v-ekologicheski> (дата обращения: 04.06.2024).
7. Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Сокольская Т.А. Экспериментальное и клиническое изучение фитопрепаратов из расторопши пятнистой. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2008; (4): 3-6.
8. Лупанова И.А., Крепкова Л.В., Ферубко Е.В., Трумпе Т.Е., Бортникова В.В., Бабенко А.Н. и др. *Новые лекарственные средства растительного происхождения ВИЛАР.* М.: ФГБНУ ВИЛАР; 2021.
9. Шульпекова Ю.О. Препараты растительного происхождения в лечении заболеваний печени. *Русский медицинский журнал.* 2006; (4): 337.
10. Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Джавахян М.А., Мизина П.Г. Исследование гепатопротекторного действия володушки экстракта сухого. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2017; (5): 27-32. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2017-80-5-27-32>
11. Бортникова В.В., Карабаева В.В., Крепкова Л.В., Сидельникова Г.Ф., Мизина П.Г., Карабаева О.Н. Флакозид — лекарственный препарат из листьев бархата амурского, в терапии заболеваний гепатобилиарной системы. *Вопросы биологической, меди-*

- цинской и фармацевтической химии. 2020; 23(2): 18-23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-02-03>
15. Бортникова В.В., Карабаева В.В., Крепкова Л.В., Мизина П.Г., Бабенко А.Н., Михеева Н.С. и др. Ретроспективный анализ клинического изучения лекарственного препарата Флакозид в терапии заболеваний гепатобилиарной системы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(3): 100-4. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104>
 24. Сайбель О.Л., Радимич А. И., Даргаева Т.Д., Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н. и др. Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(4): 36-45. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45>
 25. Сайбель О.Л., Радимич А.И., Даргаева Т.Д., Бабенко А.Н., Боровкова М.В., Курманова Е.Н. и др. Способ получения средства, обладающего гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием. Патент 2771028 Российской Федерации; 2022.
 27. Лемясева С.В., Крепкова Л.В., Бабенко А.Н. Изучение гиполипидемической активности цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) на твиновой модели. В: *Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. Материалы X Международной научно-практической конференции молодых ученых*. М.; 2022: 417-20. <https://doi.org/10.52101/9785870191058>
 28. Краснопева И.Ю. Ртутная интоксикация. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2005; 57(7): 104-8.
 34. Лупанова И.А., Мизина П.Г., Ионов Н.С., Поройков В.В., Хлебников А.И., Мартынич И.А. Влияние цикориевой и хлорогеновой кислот из *Cichorium intybus* L. на активность цитохрома P450 и глутатионтрансферазы. *Биофармацевтический журнал*. 2022; 14(5): 8-18. <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2022-14-5-8-18>
- ### References
1. Eliseeva A.V. *Environmental problems of Russian regions and their impact on the demographic situation. [Innovatsionnaya ekonomika: materialy II Mezhduнародной nauchnoy Konferentsii]* 2015: Kazan: Buk: 112-15. <https://moluch.ru/conf/econ/archive/170/8831> (In Russian)
 2. Daukaev R.A., Larionova T.K., Afonkina S.R., Allayarova G.R., Adieva G.F., Pecherskaya V.L., et al. Study of heavy metal pollution of plant products grown in the industrial region. *Meditsina truda i ekologiya cheloveka*. 2018; 3: 22-7. URL <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-zagryazneniya-tyazhelymi-metallami-rastitelnoy-produktsii-vyraschennoy-na-territorii-promyshlennogo-regiona> (Retrieved: 03.06.2024) (In Russian)
 3. Loginov A.F., Butorova L.I., Loginov V.A. Medicinal liver lesions: diagnosis, treatment. *RMZh. Gastroenterologiya*. 2016; (11): 721-7. (In Russian)
 4. Lazebnik L.B., Golovanova E.V., Hlynova O.V., Alekseenko S.A., Aryamkina O.L., Bakulin I.G., et al. Medicinal liver damage in adults. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020; 174(2): 29-54. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-174-2-29-54> (In Russian)
 5. Pavithra K.G., Rajan P.S., Kumar P.S., Rangasamy G. Mercury sources, contaminations, mercury cycle, detection and treatment techniques: A review. *Chemosphere*. 2023; 312(Pt 1): 137314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137314>
 6. Raj D., Maiti S.K. Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review. *Environ Monit Assess*. 2019; 191(9): 566. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7743-2>
 7. Antonenko O.M. Toxic liver lesions: ways of pharmacological correction. *Meditsinskiy Sovet*. 2013; (6): 45-51. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2013-6-45-51> (In Russian)
 8. Sakiev K.Z., Batyrbekova L.S. The influence of environmental factors on the state of the hepatobiliary system of the population living in ecologically unfavorable regions. *Meditsina i ekologiya*. 2015; 4(77): 8-15. URL <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-faktorov-okruzhayushchey-sredy-na-sostoyanie-hepatobiliarnoy-sistemy-naseleniya-prozhivayushchego-v-ekologicheskoi> (Retrieved: 04.06.2024) (In Russian)
 9. Nyeem M.A. B., Alam M.K., Hossain M.A. Islam M.M., Akramuzzaman M., Das S.K. A review of evidence based hepatoprotective selected medicinal plants used in Bangladeshi traditional medicine. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*. 2017; 2(5): 13-7.
 10. Krepkova L.V., Shkarenkov A.A., Sokolskaya T.A. Experimental and clinical study of phytopreparations from milk thistle. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2008; 4: 3-6. (In Russian)
 11. Lupanova I.A., Krepkova L.V., Ferubko E.V., Trumpe T.E., Bortnikova V.V., Babenko A.N., et al. *New herbal medicines VILAR. [Novye lekarstvennyye sredstva rastitel'nogo proiskhozhdeniya VILAR]*. Moscow: FGBNU VILAR; 2021. (In Russian)
 12. Shulpekova Yu.O. Herbal preparations in the treatment of liver diseases. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2006; (4): 337. (In Russian)
 13. Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Javakhyan M.A., Mizina P.G. Investigation of the hepatoprotective effect of volodushka extract of dry. *Ekspieriment'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2017; (5): 27-32. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2017-80-5-27-32> (In Russian)
 14. Bortnikova V.V., Karabaeva V.V., Krepkova L.V., Sidelnikova G.F., Mizina P.G., Karabaeva O.N. Flacoside is a medicinal product from the leaves of Amur velvet, in the treatment of diseases of the hepatobiliary system. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2020; 23(2): 18-23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-02-03> (In Russian)
 15. Bortnikova V.V., Karabaeva V.V., Krepkova L.V., Mizina P.G., Babenko A.N., Mikheeva N.S., et al. A retrospective analysis of the clinical study of the drug Flacoside in the treatment of diseases of the hepatobiliary system. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2021; 10(3): 100-4. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104> (In Russian)
 16. Krepkova L.V., Babenko A.N., Saybel' O.L., Lupanova I.A., Kuzina O.S., Job K.M., et al. Valuable hepatoprotective plants – how can we optimize waste free uses of such highly versatile resources? *Front. Pharmacol*. 2021; (12): 738504. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.738504>
 17. Domitrović R., Potočnjak I.A. comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. *Archives of toxicology*. 2016; 90(1): 39-79. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1580-z>
 18. Street R.A., Sidana J., Prinsloo G. Cichorium intybus: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 579319. <https://doi.org/10.1155/2013/579319>
 19. Aisa H.A., Xin X-l., Tang D. Chemical constituents and their pharmacological activities of plants from *Cichorium* genus. *Chinese Herbal Medicines*. 2020; 12(3): 224-36. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.05.001>
 20. Boghrati Z., Zibae E., Ayati Z., Amiri M.S., Ramezani M., Jami-alahmadi T., et al. Ethnomedicinal uses, phytochemistry and phar-

- macology of different cichorium species (Asteraceae): A review. *Adv Exp Med Biol.* 2021; (1308): 501-46. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64872-5_2
21. Janda K., Gutowska I., Geszke-Moritz M., Jakubczyk K. The common cichory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties — A Review. *Molecules.* 2021; 26(6): 1814. <https://doi.org/10.3390/molecules26061814>
 22. Upadhayay V.K., Gohar Taj.D., Samantaray S.D., Singh S.P. Contemporary insights on antibacterial and pharmacological importance of cichorium intybus: a compendious review. *Biomed J Sci & Tech Res.* 2021; 35(2): 27409-18. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2021.35.005662>
 23. Qadir I., Bazaz M.R., Dar R.M., Ovais S., Mir S.R., Zargar M.I., et al. Cichorium intybus: A comprehensive review on its pharmacological activity and phytochemistry. In book: Edible plants in health and diseases 15 March 2022; II: 373–98. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4959-2_12
 24. Sajbel' O.L., Radimich A.I., Dargaeva T.D., et al. Phenolic compounds and pharmacological screening of chicory herb extract. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv.* 2021; 10(4): 36-45. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45> (In Russian)
 25. Saibel O.L., Radimich A.I., Dargaeva T.D., Babenko A.N., Borovkova M.V., Kurmanova E.N. *Method of obtaining a drug with hepatoprotective and antihepatotoxic effects. [Sposob polucheniya sredstva, obladayushchego gepatoprotektnym i antiepatotoksicheskim deystviem].* Patent 2771028, RF; 2022. (In Russian)
 26. Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Babenko A.N., Saybel' O.L., Borovkova M.V., Kuzina O.S., et al. A perspective botanical drug: hepatoprotective activity of dry extract prepared from the aerial part of chicory plant (*Cichorium intybus* L.). *Clinical pharmacology in drug development.* Abstracts: 2021, The American College of Clinical Pharmacology®, September 15, 2021; 10(S1): 100-1. <https://doi.org/10.1002/cpdd.1004>
 27. Lemyaseva S.V., Krepkova L.V., Babenko A.N. *Study of the lipid-lowering activity of common chicory (Cichorium intybus L.) on a twin model. [Sovremennye tendentsii razvitiya tekhnologii zdorov'esberezheniya. Sbornik trudov 10 mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh].* Moscow; 2022: 417-20. <https://doi.org/10.52101/9785870191058>. (In Russian)
 28. Krasnopeeva I.Y. Mercury intoxication. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk).* 2005; 57(7): 104-8. (In Russian)
 29. Vergilio C.S., Carvalho C.E.V., Melo E.J.T. Mercury-induced dysfunctions in multiple organelles leading to cell death. *Toxicology In Vitro.* 2015; 29(1): 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.006>
 30. Tsai K.L., Kao C.L., Hung C.H., Cheng Y.H., Lin H.C., Chu P.M. Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by antioxidantaction and anti-inflammation capacity. *Oncotarget.* 2017; 8(18): 29600-12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16768>
 31. Sun W., Hesam Shahrajabian M. Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants-natural health products for human health. *Molecules.* 2023; 28(4): 1845. <https://doi.org/10.3390/molecules28041845>
 32. Garg S.S., Gupta J., Sharm S., Sahu D. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. *Eur J Pharm Sci.* 2020; 152: 105424. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105424>
 33. Garg S.S., Gupta J., Sahu D., Liu C.-J. Pharmacological and therapeutic applications of esculetin. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 20; 23(20): 12643. <https://doi.org/10.3390/ijms232012643>
 34. Lupanova I.A. Mizina P.G., Ionov N.S., Poroikov V.V., Khlebnikov A.I., Martynchik I.A. The effect of chicory and chlorogenic acids from *Cichorium intybus* L. on the activity of cytochrome P450 and glutathione transferase. *Biofarmatsevticheskii zhurnal.* 2022; 14(5): 8-18. <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2022-14-5-8-18> (In Russian)
 35. Choi R.Y., Ham J.R., Lee M.K. Esculetin prevents non-alcoholic fatty liver in diabetic mice fed high-fat diet. *Chem Biol Interact.* 2016; (260): 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.013>
 36. Pandey A., Raj P., Goru S.K., Kadakol A., Malek V., Sharma N., et al. Esculetin ameliorates hepatic fibrosis in high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease by regulation of FoxO1 mediated pathway. *Pharmacol Rep.* 2017; 69(4): 666-72. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.02.005>
 37. Xia M., Wu Z., Wang J., Buist-Homan M., Moshage Han. The coumarin-derivative esculetin protects against lipotoxicity in primary rat hepatocytes via attenuating JNK-Mediated oxidative stress and attenuates free fatty acid-induced lipid accumulation. *Antioxidants* (Basel). 2023; 12(11): 1922. <https://doi.org/10.3390/antiox12111922>
 38. Costea L., Chițescu C.L., Boscencu R., Ghica M., Lupuliasa D., Mihai D.P., et al. The polyphenolic profile and antioxidant activity of five vegetal extracts with hepatoprotective potential. *Plants* (Basel). 2022; 11(13): 1680. <https://doi.org/10.3390/plants11131680>

Сведения об авторах:

Бабенко Александра Николаевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР; e-mail: alexandra.mogileva@gmail.com;

Крепкова Любовь Вениаминовна, канд. биол. наук, зав. отделом токсикологии ФГБНУ ВИЛАР;

Лемяева Светлана Васильевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР;

Кузина Ольга Сергеевна, ст. науч. сотр. отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР;

Боровкова Марина Вячеславовна, ст. науч. сотр. отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР.

Обзоры

© Геворкян Н.М., 2024

УДК 616-092

Геворкян Н.М.

Альтернативные возможности коррекции и профилактики наследственных и врожденных патологий путем перепрограммирования клеток *in vivo* с помощью суммарных РНК лимфоцитов здоровых особей

ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»,
Россия, 119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10

Ранее нами был представлен анализ взаимосвязи патогенеза самых разных заболеваний с нарушениями регуляторной морфогенетической функции Т-лимфоцитов. На разных экспериментальных моделях было доказано, что регенераторные эффекты, вызываемые адоптивным переносом лимфоидных клеток здоровых особей, в превосходной степени воспроизводятся выделенной из них фракцией суммарной РНК, не имеющей ни аллогенного, ни ксеногенного ограничений. Таким образом была решена проблема гистосовместимости, обеспечивающая обширные возможности использования регенераторной функции лимфоцитов в медицине. Показано, что препараты суммарной РНК лимфоцитов здоровых особей способствуют «перепрограммированию» лимфоцитов реципиента, их нормализации и, соответственно, восстановлению функций, нарушенных у подопытных животных. Наряду с этим данные более чем полувековой давности свидетельствуют о возможности полной коррекции наследственных патологий (таких как остеопетроз, или «мраморная болезнь», макроцитарная анемия, гемофилия А, сахарный диабет, общая задержка роста при карликовости) путем пересадки селезенки или адоптивного переноса лимфоцитов от здоровых сибсов предварительно сублетально облученным модельным животным-реципиентам. В клинике попытки трансплантации аллогенной селезенки с целью лечения гемофилии А и болезни Гоше привели к тяжелому осложнению в виде реакции трансплантат-против-хозяина, опосредованной Т-лимфоцитами донорской селезенки. В этой связи, в целях лечения и профилактики, в случаях повышенного риска развития наследственных патологий у новорожденных, можно рекомендовать для клинических испытаний применение препаратов суммарных РНК костного мозга, селезенки, тимуса молодого здорового млекопитающего или лимфоцитов периферической крови молодого здорового донора, РНК плаценты или пуповинной крови, содержащих оптимальное соотношение нормально функционирующих субпопуляций лимфоцитов, обеспечивающих комплексное терапевтическое действие.

Ключевые слова: наследственные и врожденные патологии; регенерация; репаративные Т-лимфоциты; суммарная РНК лимфоидных клеток; экзогенная РНК; перепрограммирование *in vivo*

Для цитирования: Геворкян Н.М. Альтернативные возможности коррекции и профилактики наследственных и врожденных патологий путем перепрограммирования клеток *in vivo* с помощью суммарных РНК лимфоцитов здоровых особей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(3): 85-94.
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.85-94

Для корреспонденции: Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorgiann@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122022800499-5). (ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»).

Поступила 01.05.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Gevorkyan N.M.

Alternative possibilities for correction and prevention of hereditary and congenital pathologies by reprogramming cells *in vivo* using total RNA of lymphocytes from healthy individuals

Orehovich Research Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya St., Moscow, 119121, Russian Federation

Previously we have presented an analysis of the relationship between the pathogenesis of various diseases and disorders of the regulatory morphogenetic function of T-lymphocytes. In various experimental models, it was proven that the regenerative effects caused by the adoptive transfer of lymphoid cells from healthy individuals were reproduced to an excellent degree by a total RNA fraction isolated from these cells, that has neither allogeneic nor xenogeneic restrictions. Thus, the problem of histocompatibility was solved to provide extensive opportunities for using the regenerative function of lymphocytes in medicine. It was shown that preparations of total RNA from lymphocytes of healthy individuals contribute to the "reprogramming" of recipient's lymphocytes, their normalization and, accordingly, the restoration of functions impaired in experimental animals. Along with this, data from more than half a century ago indicated a possibility of complete correction of hereditary pathologies (such as osteopetrosis or marble bone disease, macrocytic anemia, hemophilia A, diabetes mellitus, and general growth retardation in dwarfism) by spleen transplantation or adoptive transfer of lymphocytes from healthy siblings to sub-lethally irradiated model animal recipients. In the clinic, attempts of allogeneic spleen transplantation for the treatment of hemophilia A and Gaucher disease led to a severe complication in the form of graft-versus-host disease mediated by T lymphocytes of the donor spleen. Therefore, for the purposes of treatment and prevention in cases of increased risk for developing hereditary pathologies in newborns, it can be recommended for clinical trials to use preparations of total RNA from the bone marrow, spleen, thymus from a young healthy mammal or peripheral blood lymphocytes from a young healthy donor, placental or umbilical RNA that contain an optimal ratio of normally functioning subpopulations of lymphocytes to provide a comprehensive therapeutic effect.

Keywords: hereditary and congenital pathologies; regeneration; reparative T lymphocytes; lymphoid cell total RNA; exogenous RNA; *in vivo* reprogramming

For citation: Gevorkyan N.M. Alternative possibilities for correction and prevention of hereditary and congenital pathologies by reprogramming cells *in vivo* using total RNA of lymphocytes of healthy individuals. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 85-94. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.85-94

For correspondence: *Nina M. Gevorkyan*, researcher, laboratory for protein biosynthesis of V.N. Orehovich Research Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Str., Moscow, 119121, Russian Federation, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Financing. This work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research Program for the long-term period for 2021-2030 (№ 122022800499-5).

Information about the author:

Gevorkyan N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0386-4010>

Received 01.05.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

В справочнике «Наследственные болезни» представительного авторского коллектива из 29 известных специалистов, с участием и под редакцией член-корр. АМН СССР Л.О. Бадаляна описано более 1000 наследственных синдромов и болезней, иммунная составляющая патогенеза которых большей частью неизвестна, и в целом нарушениям в ряду иммуноцитов в патогенезе наследственных болезней уделено довольно скромное место. В Справочнике в группу собственно иммунодефицитов включены заболевания, признанные к тому времени аутоиммунными, наследственные

формы дефицита компонентов системы комплемента и несколько отдельных форм нарушений гуморального и клеточного иммунитета. В качестве иммунотерапии предусмотрены трансплантация костного мозга (КМ) и/или тимуса, введение гамма-глобулина или специфических антител [1].

К настоящему времени, согласно каталогу наследственных признаков человека, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), количество нозологических форм наследственной патологии составляет уже около 16 000 синдромов (и соответствующих им

генов) [2]. В последние десятилетия, по мере интенсивного роста знаний и возможностей молекулярной биологии, генетики и биотехнологии, появились новые методы диагностики молекулярных механизмов патофизиологии моногенных болезней и, как следствие, принципиально новые варианты лечения ряда наследственных заболеваний, основанные на понимании этих механизмов и связанные с эффективным, но весьма трудоемким созданием систем геномного редактирования клеток пациента *ex vivo*, с последующей их трансплантацией обратно в его организм [3]. К группам иммунологических синдромов, встречающихся при наследственных патологиях, относят инфекционный, аллергический и аутоиммунный синдромы, первичный и вторичный иммунодефициты и иммунопролиферативный синдром [4]. В современных публикациях, наряду с указанными технологиями и помимо заместительной терапии гормонами, ферментами, назначения специальной диеты и вспомогательного медикаментозного лечения, также предусмотрено применение трансплантации КМ, тимуса, других органов и тканей, гемопоэтических и прочих стволовых клеток. При этом неизменно отмечаются проблемы, связанные с высоким риском трансплантационных процедур, с трудностями в подборе донора и посттрансплантационными осложнениями.

Универсальный способ коррекции наследственных патологий у модельных животных

Пионерские исследования уже полувековой давности свидетельствуют о принципиальной возможности коррекции разных наследственных патологий фактически одним и тем же способом (что, помимо прочего, указывает и на общность их патогенеза). Такая перспектива была продемонстрирована несколькими исследователями на разных моделях наследственных заболеваний у крыс и мышей путем переноса лимфоцитов от здоровых сибсов предварительно сублетально облученным модельным реципиентам – способ, не столь искусный и изощренный, как генная терапия, но более естественный, к тому же универсальный. Указанным способом была осуществлена коррекция остеопетроза (врожденный семейный остеосклероз, болезнь Альберс-Шенберга, или «мраморная болезнь»), редкой наследственной аномалии развития костной ткани, связанной с функциональной недостаточностью остеокластов. В результате усиленной оссификации, приводящей к уплотнению компактного слоя кости и закрытию костномозгового канала, у грызунов останавливается процесс прорезывания резцов (*incisor absent*).

У мутантных *ia*-крыс заболевание проявляется на 11-е сут после рождения. Однако если за сутки до этого срока животных облучить и перенести им лимфоциты селезенки здоровых сибсов, патология не развивается [5, 6]. Нормализацию развития кости вызывали также парабионтным соединением больных животных со здоровыми или введением фракции Т-лимфоцитов здоровых особей. Причем было показано, что после общего облучения тела и введения больным крысам лимфоцитов селезенки здоровых сибсов запускался процесс быстрого ремоделирования плотного склеротического скелета, который, согласно данным рентгенологических и гистологических анализов, в течение трех недель становился нормальным [6]. Трансплантация клеточных суспензий, полученных из тимуса, КМ или печени здоровых сибсов 10-дневного возраста, *ia*-крысам с наследственным остеопетрозом оказалась столь же эффективной, как и введение лимфоцитов селезенки. В отличие от этого, клетки, полученные из ткани головного мозга, мышц или подчелюстной слюнной железы, заметного влияния на развитие остеопетроза не оказывали. Причем отсутствие лечебного эффекта наблюдалось даже в том случае, когда количество введенных клеток суспензии головного мозга в 28 раз превышало количество тимоцитов, в то время как лишь одного миллиона последних было достаточно для ликвидации наследственной аномалии [6]. Этот результат представляет особый интерес, поскольку доказывает, что даже клетки центральной нервной системы, являющейся неотъемлемой частью интегральной гомеостатической нейро-иммуно-эндокринной системы организма, не способны, в отличие от лимфоцитов, индуцировать в другом организме оперативное изменение программы развития тканей [7].

Т-лимфоциты как основа регенераторных и патологических процессов

То, что лечебный эффект обеспечивается именно Т-лимфоцитами, наглядно показали опыты с мутантными мышами W/W_v с наследственной макроцитарной анемией [8, 9]. Трансплантация КМ от здоровых доноров восстанавливает у анемичных мышей нормальный эритропоэз, тогда как обработка донорского КМ анти-тета-сывороткой лишает его лечебного эффекта. Причем терапевтическое действие инактивированного таким образом КМ восстанавливается при добавлении к нему всего от одной до десяти тысяч нормальных тимоцитов. Следовательно, и стволовые клетки КМ, при их адоптивном переносе, как и ткань головного мозга, не способны индуцировать изменения программы регуляции развития тканей.

Успешный опыт по нормализации общей задержки роста при карликовости мышей путем переноса лимфоцитов от здоровых животных [10] объясняется наличием на мембране Т-лимфоцитов рецепторов к соматотропному гормону, число которых в период активного роста организма возрастает [10, 11].

На причастность Т-лимфоцитов к развитию наследственного инсулинозависимого диабета у крыс указывает факт предотвращения болезни при неонатальной тимэктомии или при введении животным моноклональных антител против Т-лимфоцитов [11-13]. Исследования роли Т-лимфоцитов в реализации генетически обусловленного диабетогенеза у крыс с наследственной предрасположенностью к этому заболеванию, проявляющемуся в возрасте от 56 до 130 дней после рождения, выявили у всех животных лимфоцитопению со сниженным уровнем Т-хелперов и очень низким уровнем или полным отсутствием цитотоксических Т-лимфоцитов [14-16]. Адоптивный перенос лимфоцитов здоровых животных таким крысам до срока постнатальной экспрессии у них дефектного гена полностью избавлял от развития заболевания [5, 9, 15, 16]. И наоборот, перенос лимфоцитов заболевших животных здоровым крысам воспроизводил у них инсулинозависимый диабет, и тоже на всю последующую жизнь [16, 17]. Этот аспект представляет еще и отдельный интерес в плане возможностей выяснения патогенеза и подходов к лечению, поскольку может быть связан с альтернативным способом создания животных моделей заболеваний, значительно более простым, нежели те, которые создаются с использованием генетических технологий, и значительно более ускоренным, нежели получение линейных животных с тем или иным генетическим дефектом в результате близкородственных скрещиваний в 20 поколениях сибсов. Однако подтверждение такой возможности потребует дальнейших экспериментов для каждой категории наследственных заболеваний. Так, известно, что лимфоциты осуществляют перенос инсулинозависимого диабета от человека мышам [18], перенос индуцированного стрептозотоцином диабета у мышей [19], вызванного аллоксаном диабета у крыс [20], экспериментального аллергического орхита [21], аллергического артрита [22], контактной экземы [23], экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [24], аутоиммунного адреналита [25], миастении [26], амилоидоза [27], анемии, вызванной хроническим отравлением мышьяксодержащим соединением [28]. Все эти факты, свидетельствующие о непосредственном участии лимфоидных клеток в механизмах патогенеза и восстановительных процессов при самых разных,

в том числе и наследственных, заболеваниях и нарушениях, отражены в наших монографиях [7, 45].

Поиски возможностей клинического применения саногенетических свойств Т-лимфоцитов

В клинике, попытки трансплантации аллогенной селезенки с целью лечения моногенных наследственных заболеваний, таких как гемофилия А и болезнь Гоше, приводили к тяжелому осложнению в виде реакции трансплантат-против-хозяина (РТПХ), опосредованной Т-лимфоцитами донорской селезенки [29]. В более поздних публикациях, в поисках реальных возможностей клинического применения, была предпринята попытка лечения моногенных наследственных заболеваний путем подбора оптимального срока эмбрионального развития для успешной трансплантации менее иммуногенной ткани эмбриональной селезенки с целью эффективной заместительной терапии. В результате удалось выяснить [30], что оптимальной для коррекции гемофилии А у иммунодефицитных мышей SCID (Sever Combined Immunodeficient mice) является ткань селезенки 42-дневного плода свиньи (E42) (полный срок беременности – 118 дней), когда селезенка уже вырабатывает антигемофильный фактор VIII, способный адекватно функционировать в организме реципиента, но еще не столь иммуногенна, поскольку не содержит к этому сроку Т-лимфоцитов, вызывающих реакцию РТПХ. Показано также, что в условиях иммуносупрессии удается добиться успешной трансплантации 42-дневной эмбриональной ткани селезенки свиньи даже иммунокомпетентным мышам C57BL/6. Предварительные результаты этой группы исследователей свидетельствуют о том, что в 42-дневной селезенке эмбриона свиньи экспрессируется не только фактор VIII, но и другие важные продукты генов, с дефектами которых связаны проявления болезни Гоше и многих других моногенных наследственных заболеваний.

К настоящему времени получено достаточное количество неопровержимых доказательств участия системы Т-лимфоцитов в развитии практически любой патологии [31]. При этом лимфоциты, с присущей любой истинно регуляторной системе особенностью, способны осуществлять оба регулирующих эффекта: стимулирующий (CD4⁺ Т-хелперы) и тормозящий (CD8⁺ Т-супрессоры-киллеры) [7, 31]. Так, в норме Т-лимфоциты участвуют в процессах физиологической и репаративной регенерации органов и тканей; при их адоптивном переносе эти клетки осуществляют саногенетические эффекты в организме реципиента [5-13, 29-34]; тогда как при патологии Т-лимфоциты выполняют патогенетическую роль как у самого больного, так и спо-

собны индуцировать ее в организме реципиента [7, 14-19, 21-23].

Совокупность перечисленных фактов вызывает вопрос: чем объяснить столь универсальную способность именно Т-лимфоцитов или богатых Т-лимфоцитами тканей здоровых особей устранять дефицит функций разных органных систем?

Например, успешной была и ксеногенная трансплантация ткани поджелудочной железы (п/ж) 42-дневного эмбриона свиньи под капсулу почки иммунодефицитным мышам NOD-SCID и иммунокомпетентным мышам C57BL/6 с диабетом, вызванным у тех и других аллоксаном или стрептозотоцином [35]. В этих случаях тоже удавалось, под защитой иммуносупрессии, нормализовать уровень глюкозы крови. Однако дальнейшее удаление трансплантата вызвало необратимую гипергликемию. В этом также проявляется одно из существенных отличий лимфоцитов, действие которых «прививается» организму реципиента, «обучая» клетки его иммунной системы выполнять ту или иную функцию. Интересно, что у иммунокомпетентных мышей, в отсутствие иммуносупрессии, между 8 и 10 днями после трансплантации наблюдали полное отторжение эмбриональной ткани п/ж всех сроков беременности свиньи, от E28 до E100, с инфльтрацией и фиброзом в области трансплантата. При этом у безтимусных мышей наблюдался активный рост и развитие трансплантата ткани п/ж оптимального срока E42, в доказательство того, что отторжение опосредовано именно Т-лимфоцитами. Сходные результаты были описаны также и в отношении почечной ткани эмбрионов человека и свиньи [36].

В справочнике по наследственным болезням 2017 года (под редакцией Е.К. Гинтера и В.П. Пузырева) указано, что сотни наследственных заболеваний печени, ключевого метаболического органа, биосинтетическая активность которого обеспечивает большинство важнейших биохимических функций, являются моногенными заболеваниями. Очевидно, что во всех этих случаях трансплантация нормальной печеночной ткани была бы уместной и эффективной [37]. Однако, к сожалению, не только ксеногенная, но и аллогенная трансплантация тканей требует соблюдения условий гистосовместимости (что связано с длительным подбором подходящего донора) и иммуносупрессии (весьма серьезно отражающейся на качестве жизни). Что же касается трансплантации селезенки или лимфоидных клеток, их особо выраженная иммуногенность и связанный с этим высокий риск развития угрожающей жизни РТПХ при их адоптивном переносе препятствует возможности устранения врожден-

ных патологий в клинике указанным выше способом. Видимо, поэтому, а также с учетом того, что печень, обладая тропизмом к генотерапевтическим векторам, является идеальной мишенью для современных биотехнологий [38], перспективными считаются значительно более сложные и дорогостоящие методы генной терапии.

Эффект клональной организации циркулирующих лимфоцитов

В отличие от тканей соolidных органов, трансплантация каждой из которых может вызвать соответствующий тканеспецифический эффект, совокупность Т-лимфоцитов тимуса, селезенки или периферической крови в норме способна обеспечить не только заместительные эффекты при функциональной несостоятельности самых разных соматических клеток в организме реципиента, но и нормальную регуляцию их активности [7, 11, 29-34, 39-41]. Такое многообразие регуляторных тканеспецифических эффектов обеспечивается клональной организацией клеток иммунной системы и связано с наличием в ней особых субпопуляций морфогенетических (репаративных) тканеспецифических $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, *не участвующих в иммунных реакциях на чужеродные антигены* [31, 44].

Согласно предлагаемой концепции, в многоклеточном организме совокупность клонов морфогенетически компетентных Т-лимфоцитов представляет собой специализированную адаптивную гомеостатическую систему клональной регуляции пролиферации соматических клеток каждого гистотипа в отдельности, где представители каждого клона являются прообразом соматических клеток своей ткани-мишени, ее подвижным прототипом [31, 44]. Именно этим обусловлено то, что при наследственных болезнях обмена веществ трансплантация не только здоровой печени, но и селезенки может обеспечить нормализацию сотен энзимопатий. На мембранах по-разному функционирующих тканеспецифических клонов Т-лимфоцитов в совокупности обнаружены рецепторы ко всевозможным продуцируемым в организме биологически активным веществам. В пользу указанной концепции, помимо наличия на регуляторных тканеспецифических клонах Т-лимфоцитов всевозможных рецепторов, свидетельствует также и способность Т-клеток, подобно клеткам их тканей-мишеней, синтезировать и секретировать самые разные биологически активные вещества, включая гормоны и факторы роста [11, 31-34, 39-42].

Перечисленные свойства всей совокупности клонов регуляторных морфогенетических репаративных Т-лимфоцитов здоровых молодых индивидов объяс-

няют их уникальные восстановительные способности: при трансплантации происходит тканеспецифическое перепрограммирование и – в результате – нормализация тех популяций клеток реципиента, функционирование которых нарушено. Это тот редкий случай, когда *универсальное воздействие может обеспечить нормализацию разных нарушений*. К тому же процесс получения циркулирующих лимфоцитов здорового донора и перенос их реципиенту не представляет особых трудностей. Тогда как трансплантация печени, почек, п/ж, легких и прочих солидных органов и тканей технически значительно более проблематична, поскольку связана с серьезным хирургическим вмешательством и с острой проблемой наличия донорских органов вообще и подходящих органов гистосовместимых доноров, в частности. Однако, несмотря на явные преимущества использования экзогенных лимфоцитов в восстановительных процессах у млекопитающих, серьезным препятствием является особо выраженная иммуногенность самих этих клеток.

Суммарная РНК лимфоидных клеток как средство реализации регенераторной функции Т-лимфоцитов в медицине.

В поисках альтернативы лимфоидным клеткам как таковым – например, субклеточной фракции, которая лишена была бы иммуногенных свойств самих лимфоцитов и при этом полностью воспроизводила бы их регенераторные свойства, мы обнаружили, что сочетание обоих этих признаков в полной мере присуще фракции суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов селезенки, тимуса или периферической крови здорового млекопитающего. Не вызывающий иммунного отторжения ни при аллогенном, ни при ксеногенном переносе, такой препарат лимфоцитарной РНК сохраняет функциональные свойства самих лимфоцитов, присущие им в момент их изъятия из организма, и, следовательно, может считаться *молекулярной основой, обеспечивающей процессы регенерации нарушенных функций*. Это в полной мере подтверждают результаты наших модельных экспериментов, проводимых на белых беспородных крысах. Суммарную РНК выделяли из разных органов (включая тимус, селезенку и КМ) крыс и поросенка, из бычьей селезенки, из плаценты и лимфоцитов периферической и пуповинной крови человека. Высокая эффективность профилактического и лечебного восстановительного действия указанных препаратов суммарных РНК в отношении гемопоэза была доказана при остром сублетальном гамма-облучении крыс, при вызванной бензолом токсической гипопластической анемии, продемонстрирована возможность полной и необратимой нормализации уровня глюко-

зы крови у всех 65 крыс со стойким аллоксановым диабетом, возможность устранения вызванной сульпиридом у взрослых крыс экспериментальной гиперплазии предстательной железы и многое другое [31, 43-45].

Особо выраженная чувствительность к всевозможным изменениям внутренней среды и внешних воздействий, в сочетании с их обоюдной реактивностью с тканью-мишенью, объясняет и патогенетическую роль Т-лимфоцитов больных, и терапевтическое действие Т-лимфоцитов здоровых особей в коррекции нарушенных функций организма [29-34, 39-41, 43-46].

Обладая особой чувствительностью к воздействиям, которые могут отрицательно сказаться на их ткани-мишени, лимфоциты совместно с другими гомеостатическими системами организма вырабатывают наиболее оптимальную жизнеспасающую схему адаптивных изменений, реализуемых ими в процессе их регуляторного влияния на ткани-мишени. Особенно важно то, что при введении препаратов суммарной РНК лимфоцитов селезенки, тимуса или периферической крови (как и при адоптивном переносе самих лимфоцитов) весь этот комплекс адаптивных изменений в точности воспроизводится в организме реципиента [20, 31, 43-45, 47]. Более того, сравнительный анализ активности клеток КМ и выделенного из КМ препарата суммарной РНК в отношении регенерации печени после частичной гепатэктомии показал, что препарат РНК в 2,3 раза более эффективен в процессах восстановления, чем сами клетки этого центрального лимфоидного органа, и на сутки опережает их в индукции максимальной митотической активности клеток печени [48].

Кроме того, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что для изменения программы работы генов с помощью препаратов суммарных РНК лимфоидных клеток вовсе не обязательно предварительно облучать животных: во-первых, РНК, в отличие от самих лимфоцитов, не вызывает иммунного отторжения, а во-вторых, лимфоциты реципиента, в силу поликлональной организации системы иммунных клеток, не мешают нормализации нарушенных функций, которая независимо происходит на уровне отдельных клонов лимфоцитов и их тканей-мишеней. А наш единичный опыт нормализации функциональной реактивности иммунной системы при наследственном atopическом дерматите у собаки подсказывает, что восстановительный эффект можно индуцировать вовсе не только в раннем постнатальном периоде. Помимо этого, в наших опытах продемонстрирована высокая эффективность не только аллогенных, но и ксеногенных, и смешанных препаратов РНК. Относитель-

но возможности использования ксеногенных РНК в медицине отметим, что препараты суммарных РНК из 50 разновидностей органов и тканей крупного рогатого скота под общим названием *Regeneresen* в течение ряда лет в условиях ветеринарного контроля успешно производила для медицинского применения немецкая компания *Dycckerhoff Pharma*. Однако отсутствие, как мы полагаем, у производителей концептуального понимания *особой роли* лимфоидных клеток в процессах регенерации приравнивало в их представлении действие суммарных РНК лимфоидных органов эффектам РНК прочих органов и тканей, что и отражалось в рекомендациях по применению, приводя к недостаточно стойким эффектам.

Адресная доставка экзогенных РНК и перепрограммирование клеток *in vivo*

Возвращаясь к признанным в настоящее время перспективными методам генной терапии путем геномного редактирования клеток пациента *ex vivo* [3, 38, 49] или с использованием вирусных векторов [4, 50], стоит отметить следующее. Способы и средства доставки генов или генно-инженерных конструкций в разные типы клеток и участки генома человека сопряжены с немалыми трудностями, такими как создание биотехнологическим путем специальных структур, имитирующих в организме поведение вирусной частицы, но не вызывающих инфекционный процесс. Тогда как без каких-либо специальных приспособлений уже через 45 с в лимфоидные клетки селезенки проникает экзогенная гомологичная суммарная РНК, а через 3 мин экзогенная суммарная РНК лимфоцитов периферической крови человека обнаруживается внутри аллогенных лимфоцитов и ксеногенных лимфоидных клеток селезенки мышей, с сохранением ее функциональных свойств [7, 44, 45]. Гетерологичная суммарная РНК лимфоидных клеток, также не вызывающая иммунной реакции в чужеродном организме, обеспечивает в нем соответствующие адаптивные изменения в клетках их тканей-мишеней, осуществляя тем самым перепрограммирование последних *in vivo*. Об этом свидетельствуют наши опыты, в которых введение всего 15 мкг/100 г массы тела суммарной РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом вызывало у интактных животных выраженную гипергликемию, а в результате введения суммарных РНК лимфоидных клеток здоровых особей крысам со стойким аллоксановым диабетом у последних устанавливалась стойкая нормогликемия (*тоже через три недели! — см. выше о сроках нормализации костной ткани при остеопетрозе в результате введения нормальных лимфоцитов!*),

после чего суммарная РНК лимфоцитов селезенки выделенных таким образом животных, вводимая интактным крысам, не вызывала ни у одной из них повышения уровня глюкозы крови [20, 43, 44].

Заключение

Описанные здесь факты и достижения открывают реальные перспективы в содействии профилактики и лечению моногенных и многофакторных наследственных болезней и врожденных патологий, включая такие как детский церебральный паралич, диабет 1 типа, врожденная глухота (в случаях нарушенной нервной проводимости) и многие другие.

Подтвердившие высокую эффективность в нормализации различных функций организма препараты экзогенных суммарных РНК соматических клеток, включая органные и стволовые, а также суммарные РНК плаценты, пуповинной крови и пупочного канатика, вводимые совместно с суммарной РНК лимфоидных клеток, можно рекомендовать для клинических испытаний в качестве альтернативного способа лечения и профилактики (в случаях повышенного риска развития) наследственных патологий у новорожденных; препараты эти не имеют ни аллогенного, ни ксеногенного ограничений, они стабильны, особенно в лиофилизированной форме, и эффективны при внутривенном, внутрибрюшинном и интраназальном введении. Совокупность суммарных РНК лимфоидных клеток тимуса, селезенки молодой здоровой особи или периферической крови здорового донора, содержащих оптимальное соотношение функциональных субпопуляций лимфоцитов, обеспечивает комплексное терапевтическое действие, поскольку индуцирует в организме реципиента нормальные адаптивные реакции, предоставляя возможность самому организму использовать из этой совокупности недостающее у него звено для компенсации дефекта той или иной функциональной системы.

Литература

(п.п. 2; 5; 6; 8; 9; 12-19; 21-27; 29; 30; 35-36; 38; 42; 46; 49 см. References)

1. Бадалян Л.О., Вельтишев Ю.Е., Виноградова Т.В. и др. *Наследственные болезни. Справочник*. Под ред. Бадаляна Л.О. Ташкент: Медицина; 1980.
3. Слесаренко Я.С., Лавров А.В., Смирнихина С.А. Клинические исследования для лечения наследственных заболеваний методами геномного редактирования. *Гены & Клетки*. 2020; XV(2): 51-5. DOI: 10.23868/202004023
4. Качук Е.А., Семинский И.Ж. Синдромальный подход в диагностике наследственных заболеваний (лекция). *Байкальский медицинский журнал*. 2023; 2(4): 85-94. <https://doi.org/10.57256/2949-0715-2023-2-4-85-94>

7. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: РАМН; 2009.
10. Мартыненко Ф.П., Шостак И.Н. Влияние соматотропина на образование аутологичных розеток тимоцитами гипотиреоидных крыс. *ДАН СССР*. 1982; Серия Б. (2): 67-72.
11. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(2): 189-202.
20. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(2): 85-8. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2020.02.85-88>
28. Белан Е.И., Скальная М.Г. Изменение эритропоэза у нормальных мышей под воздействием перитонеальных клеток, трансплантированных от сингенных доноров с длительной интоксикацией арсенитом натрия. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1999; 128(12): 646-9.
31. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Патогенез как проблема функциональной несостоятельности и дисбаланса в популяции Т-лимфоцитов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(2): 109-19. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.02>
32. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Влияние морфогенетической активности лимфоцитов на реактивность и резистентность организма. *Онтогенез*. 2018; 49(1): 54-66.
33. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Т-лимфоциты и тканевые факторы роста. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101(8): 865-84.
34. Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. *Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений*. М.: Наука, 1987.
37. *Наследственные болезни. Национальное руководство. Краткое издание*. Под ред. Гинтера Е.К., Пузырева В.П. ГЭОТАР-Медиа. 2017, 464 с.
39. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии*. 2016; 136(1): 81-95.
40. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280-301.
41. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. О чувствительности Т-лимфоцитов к гормонам аденогипофиза. *Успехи физиологических наук*. 2017; 48(1): 80-90.
43. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Альтернативный способ «перепрограммирования» лимфоцитов. *Гены & Клетки*. 2022; 17(3). ISSN 2313-1829. *Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине*. М., 23-25 ноября 2022 г.
44. Геворкян Н.М. Повышение эффективности терапии стволовыми клетками при содействии суммарных РНК лимфоцитов здоровых доноров. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(3): 124-36. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.03.124-36>
45. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. М.; 2016.
47. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. *Очерки об особенностях изучения эффектов РНК и об РНК-терапии*. М.; 2019.
48. Гоникова З.З., Никольская А.О., Кирсанова Л.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Севастьянов В.И. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печеночными клетками костного мозга и общей РНК этих клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21(1): 113-21. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-113-121>
50. *Супоннический М.В.* Генотерапевтические векторные системы на основе вирусов. *Биопрепараты*. 2011; (3): 15-26.

References

1. Badalyan L.O., Veltishchev Yu.E., Vinogradova T.V., et al. *Hereditary diseases. Handbook. [Nasledstvennyye bolezni. Spravochnik]*. Ed., Badalyan L.O. Tashkent: Meditsina; 1980.
2. *Online Mendelian inheritance in man*. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, 2023. URL: <https://www.omim.org/help/copyright> [date of access: 02.10.2023]
3. Slesarenko Ya.S., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Clinical studies for the treatment of hereditary diseases using genomic editing methods. *Geny & Kletki*. 2020; XV(2): 51-5. <https://doi.org/10.23868/202004023> (In Russian)
4. Tkachuk E.A., Seminskiy I.Zh. Syndromic approach to the diagnosis of hereditary diseases (lecture). *Baykalskiy meditsinskiy zhurnal*. 2023; 2(4): 85-94. <https://doi.org/10.57256/2949-0715-2023-2-4-85-94> (In Russian)
5. Walker D.G. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science*. 1975; 190(4216): 784-5.
6. Marks S.C., Jr. Studies of the cellular cure for osteopetrosis by transplanted cells: specificity of the cell type in IA rats. *Amer. J. Anat.* 1978; 151(1): 131-8.
7. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov E.A. *The role of lymphocytes in prompt changes in the tissue development program. [Rol' limfotsitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney]*. Moscow: RAMN; 2009. (In Russian)
8. Sharkis S.J., Jedrzejczak W.W., Ahmed A., Santos G.W., McKee A., Sell K.W. Antitheta-sensitive regulatory cell (TSRC) and hematopoiesis: Regulation of differentiation of transplanted stem cells in W/W^u, anemic and normal mice. *Blood*. 1978; 52(4): 802-17.
9. Jedrzejczak W.W., Sharkis S.J., Ahmed A., Sell K.W., Santos G.W. Theta-sensitive cell and erythropoiesis: identification of a defect in W/W^u anemic mice. *Science*. 1977; 196(4287): 313-5.
10. Martynenko F.P., Shostak I.N. Effect of somatotropin on the formation of autologous rosettes by thymocytes of hypothyroid rats. *DAN SSSR*. 1982; Seriya B(2): 67-72. (In Russian)
11. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in the hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspexhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(2): 189-202. (In Russian)
12. Like A.A., Kislaukis E., Williams R.R., Rossini A.A. Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science*. 1982; 216(4546): 644-6.
13. Like A.A., Biron C.A., Weringer E.J., Byman K., Sroczyński E., Guberski D.I. Prevention of diabetes in BioBreeding/Worcester rats

- with monoclonal antibodies that recognize T-lymphocytes or natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1986; 164(4): 1145-59.
14. Dale L., Greiner D.L., Mordes J.P., Handler E.S., Angelillo M., Nakamura N., et al. Depletion of RT6.1⁺ T-lymphocytes induces diabetes in resistant BioBreeding/Worcester (BB/W) rats. *J. Exp. Med.* 1987; 166(2): 461-75.
 15. Metroz-Dayer M.D., Mouland A., Brideau C., Duhamel D., Poussier P. Adoptive transfer of diabetes in BB rats induced by CD4 T-lymphocytes. *Diabetes.* 1990; 39(8): 928-32.
 16. MacKay P., Studstrup L. Old normoglycaemic BB rats as donors and recipients of adoptively transferred diabetes. *Autoimmunity.* 1993; 15 (Suppl. 1). Abstr. 48.
 17. Eduard P., Hiserodt J.C., Plamondon C., Poussier P. CD8+ T-cells are required for adoptive transfer of the BB rat diabetic syndrome. *Diabetes.* 1993; 42(3): 390-7.
 18. Buschard K., Madsbad S., Rygaard J. Passive transfer of diabetes mellitus from man to mouse. *Lancet.* 1978; 1(8070): 908-10.
 19. Buschard K., Rygaard J. T-lymphocytes transfer streptozotocin induced diabetes mellitus in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. C.* 1978; 86C(6): 277-82.
 20. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. On the phenomenon of increased sensitivity of rats that previously suffered from alloxan diabetes to the diabetogenic effects of total RNA. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2020; 64(2): 85-8. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2020.02.85-88> (In Russian)
 21. Tung K.S., Keong C., McCarty T. Pathogenesis of experimental allergic orchitis. III. T-lymphocyte requirement in local adoptive transfer by peritoneal exudate cells. *J. Immunol.* 1977; 118(5): 1774-9.
 22. Brackertz D., Mitchell G.F., Vadas M.A., MacKay I.R. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J. Immunol.* 1977; 118(5): 1645-8.
 23. Zembala M., Asherson G.L., Munro A.J., Tagart V.B. Suppressor T-cell product, which depresses the passive transfer of contact sensitivity, shares epitope(s) with the major histocompatibility complex. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1977; 54(2): 183-6.
 24. Wekerle H., Fierz W. *T-lymphocyte autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Organ based autoimmune diseases. Ed. J.M. Cruse, E.R. Jr. Lewis. Basel, 1985.
 25. Werdelin O. The origin, nature, and specificity of monoclonal cells in experimental inflammations. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1972; 232: 3-91.
 26. Tarrab-Hazdi R., Aharonov A., Abramsky O., Yaar I., Fuchs S. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia by lymph node cells in inbred guinea pigs. *J. Exp. Med.* 1975; 142(3): 785-9.
 27. Werdelin O., Ranlov P. Amyloidosis in mice produced by transplantation of spleen cells from casein-treated mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1966; 68(1): 1-18.
 28. Belan E.I., Skalnaya M.G. Changes in erythropoiesis in normal mice under exposure to peritoneal cells transplanted from syngeneic donors with long-term intoxication with sodium arsenite. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 1999; 128(12): 646-9. (In Russian)
 29. Xia S.S., Jiang H.C., Zhou X.X., He G. Treatment of hemophilia A by living mother-to-son splenic transplantation. First case report in the world. *Clin. Med. J. (Engl.).* 1992; 105: 609-11.
 30. Aronovich A., Tchorsh D., Katchman H., Eventov-Friedman S., Shezen E., Martinowitz B.R. Correction of hemophilia as a proof of concept for treatment of monogenic diseases by fetal spleen transplantation. *PNAS.* 2006; 103(50): 19075-80.
 31. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. Pathogenesis as a problem of functional failure and imbalance in the T-lymphocyte population. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2021; 65(2): 109-19. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.02> (In Russian)
 32. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The influence of morphogenetic activity of lymphocytes on the reactivity and resistance of the body. *Ontogenez.* 2018; 49(1): 54-66. (In Russian)
 33. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. T-lymphocytes and tissue growth factors. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2015; 101(8): 865-84. (In Russian)
 34. Babaeva A.G., Zotikov E.A. *Immunology of the processes of adaptive growth, proliferation and their disorders. [Immunologiya protsessov adaptivnogo rosta, proliferatsii i ikh narusheniya].* Moscow: Nauka; 1987. (In Russian)
 35. Eventov-Friedman S., Tchorsh D., Katchman H., Shezen E., Aronovich A., Hecht G., et al. Embryonic pig pancreatic tissue transplantation for the treatment of diabetes. *PLoS Med.* 2006; 3(7): e215: 1165-76.
 36. Kim S.S., Park H.J., Han J., Gwak S.J., Park M.H., Song K.W., et al. Improvement of kidney failure with fetal kidney precursor cell transplantation. *Transplantation.* 2007. 83(9): 1249-58.
 37. *Hereditary diseases. National guidelines. Brief edition. [Nasledstvennyye bolezni. Natsional'noye rukovodstvo. Kratkoye izdaniye].* Ed. by Ginter E.K., Puzyrev V.P. GEOTAR-Media. 2017.
 38. Ghasemzad M., Hashemi M., Lavasani Z.M., Hossein-khannazer N., Bakhshandeh H., Gramignoli R., et al. Novel Gene-Correction-Based Therapeutic Modalities for Monogenic Liver Disorders. *Bioengineering.* 2022; 9: 392-419. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080392>
 39. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. Modern view on the role of T-lymphocytes in the regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2016; 136(1): 81-95. (In Russian)
 40. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocyte RNAs in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2016; 102(11): 1280-301. (In Russian)
 41. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. On the sensitivity of T-lymphocytes to hormones of the adenohipophysis. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk.* 2017; 48(1): 80-90. (In Russian)
 42. Weigent D.A. Expression of lymphocyte-derived growth hormone (GH) and GH-releasing hormone receptors in aging rats. *Cell Immunol.* 2013; 282(2): 71-8.
 43. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *An alternative way to "reprogram" lymphocytes. Proceedings of the V National Congress on Regenerative Medicine. [Materialy V natsional'nogo kongressa po regenerativnoy meditsine].* Moscow, 23-25 noyabrya 2022. Moscow, November 20-23. Genes & Cells. 2022 r. 17(3). (In Russian)
 44. Gevorkyan N.M. Increasing the effectiveness of stem cell therapy with the assistance of total RNA of lymphocytes from healthy donors. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2023; 67(3): 124-36. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.03.124-36> (In Russian)
 45. *Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. On the morphogenetic properties of RNA in lymphoid and stem cells during regenerative processes. [O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh protsessakh].* Moscow: 2016. (In Russian)

46. Latha T.S., Reddy M.C., Durbaka P.V.R., Rachamalla A., Pallu R., Lomada D. $\gamma\delta$ T cell-mediated immune responses in disease and therapy. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5(Art. 571): 1-11.
47. *Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V.* Essays on features of study effects of RNA and RNA-therapy. [*Ocherki ob osobennostyakh izucheniya effektivnosti RNK i ob RNK-terapii*]. Moscow: 2019. (In Russian)
48. Gonikova Z.Z., Nikolskaya A.O., Kirsanova L.A., Shagidulin M.Yu., Onishchenko N.A., Sevastianov V.I. The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2019; 21(1): 113-21. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-113-121 (In Russian)
49. Pierce G.F. Uncertainty in an era of transformative therapy for haemophilia: Addressing the unknowns. *Haemophilia*. 2021; 27 (Suppl. 3): 103–13. <https://doi.org/10.1111/hae.14023>
50. Supotnitskiy M.V. Virus-based gene therapy vector systems. *Bio-preparaty*. 2011; (3): 15-26. (In Russian)

Сведения об авторе:

Геворкян Нина Михайловна, науч. сотр. лаб. биосинтеза белков ФГБНУ «НИИ биомедхимии им. В.Н. Ореховича» РАН, e-mail: gevorkiann@yandex.ru