

---

# **ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ**

---

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал  
Издается с 1957 г.

**4**

**Vol. 68**

**2024**



**В.В. Пашутин  
(1845 – 1901)**

Свидетельство о регистрации  
СМИ: рег. № 1086 от 7.12.1990 г.,  
зарегистрировано  
Государственным Комитетом СССР  
по печати.  
В запись о регистрации СМИ  
внесены изменения Федеральной  
службой по надзору в сфере  
связи, информационных  
технологий и массовых  
коммуникаций - рег. номер ПИ  
№ ФС77-84858 от 21.03.2023 г.

Адрес редакции:  
125315, Москва, ул. Балтийская, 8,  
ФГБНУ «НИИОПП», к. 379

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Сайт: www.pfiet.ru

Издатель:  
ИП Сальникова Галина Николаевна  
E-mail: galina.salnikova@inbox.ru

Входит в Перечень ведущих рецензируе-  
мых научных журналов и изданий, реко-  
мендованных ВАК России для публика-  
ции значимых результатов диссертации  
на соискание ученой степени доктора и  
кандидата наук

Двухлетний импакт-фактор  
по версии РИНЦ на 2023 г.: 0,560

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  
Редактор 1-й категории Н.Р. Соболев  
Технический редактор Е.М. Архипова

Сдано в набор 05.12.2024  
Подписано к печати 11.12.2024  
Опубликовано 20.12.2024

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. № 4, 1–86.

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.

© Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт  
общей патологии и патофизиологии»,  
2024.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»  
Российское научное общество патофизиологов

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал  
Основан в 1957 г.

Том 68 № 4 · 2024

Октябрь–Декабрь

## 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:

Т.В. Давыдова, *д.м.н., ФГБНУ «НИИОПП», Москва*

## Редакционная коллегия:

В.М. Баранов, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБУ ГНЦ «ФМБЦ им. А.И. Бурназяна», ФМБА, Москва*  
Т.Д. Власов, *д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Первый СПбГМУ им. И. П. Павлова», Санкт-Петербург*  
М.М. Галагудза, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», 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., ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва*  
М.А. Даренская, *д.б.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., ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва*  
Н.Е. Кушлинский, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБУ «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, Хигашиосака, Япония*  
Г.В. Порядин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «РНМУ им. Н.И. Пирогова», Москва*  
Р. Сьюелл, *д.б.н., проф., Университет Кардиффа, Кардифф, Великобритания*  
О.И. Уразова, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО СибГМУ, Томск*  
О.В. Шамова, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург*  
Б.Г. Юшков, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБН «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., ФГБНУ «НЦ неврологии», Москва*  
Ю.Ю. Бяловский, *д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «РязГМУ», Рязань*  
О.И. Гурина, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБУ «НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского», Москва*  
О.М. Драпкина, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФГБУ «НМИЦ ТПМ», 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., ООО «АМИ ЦДО», Барнаул*  
В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Ярославский ГМУ», Ярославль*  
Д.Б. Никитюк, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБНУ «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва*  
В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*  
М.В. Осиков, *д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «ЮУГМУ», Челябинск*  
Д.А. Сычев, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБОУ ДПО «РМАПО», Москва*  
А.А. Чурин, *д.м.н., проф., 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*

**Media Registration Certificate:**  
reg. No. 1086 dated 7.12.1990, registered  
by the USSR State Press Committee.

The record of media registration  
has been amended by the Federal Service  
for Supervision of Communications,  
Information Technology and Mass  
Communications - registration number PI  
No. FS77-84858 dated 21.03.2023

**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

**Publisher:**

IP Salnikova Galina Nikolaevna

**E-mail:** galina.salnikova@inbox.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 2023 was 0,560

Subscription Index in «Rospechat»:  
71456

Subscription Index in «Ural Press»:  
71456

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

Issuing editor *N.Yu. Klishina*  
Editor of 1<sup>st</sup> category *N.R. Sobol*  
Technical Editor *E.M. Arkhipova*

Sent into set on 05.12.2024  
Signed for publication on 11.12.2024  
Published on 20.12.2024

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 4. 1–86.

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.

©Federal State Scientific Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 2024.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Federal State Scientific Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»

Russian Scientific Society of Pathophysiolgists

# PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

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

Vol. 68 № 4 · 2024

October–December

**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:**

T.V. Davydova, *DSc, Institute 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*

M.M. Galagudza, *DSc, Prof., Corr. Member of RAS, «NMRC named after V.A. Almazov», 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. Kubyshkin, *DSc, Prof., «V.I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, Russia*

D.A. Kudlay, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

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.I. Urazova, *DSc, Prof., Corr. Member of RAS, Sib. State Med. University, Tomsk*

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., NMRC of Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Moscow*

O.M. Drapkin, *acad. RAS, MD, Prof., «NMRC 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 Med. 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

- Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Селезнева Ан.Д., Пронина И.В., Меркулова Д.М., Казубская Т.П., Бурдённий А.М., Брага Э.А., Логинов В.И.** Изменение метилирования группы апоптоз-ассоциированных белок-кодирующих генов и генов длинных некодирующих РНК как фактор в нарушении их экспрессии при раке молочной железы..... 4
- Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И.** Сравнительный анализ тромбобезопасности при использовании транексамовой кислоты и фибрин-мономера на фоне антиагрегантной или фибринолитической терапии в эксперименте..... 14
- Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В., Харитонов М.А., Толкач П.Г., Ярошенко Д.М., Арсентьев Л.В., Грачёва Г.Ю., Илатовская Ю.Д.** Экспериментальная оценка эффективности респираторной поддержки для коррекции токсического отёка лёгких..... 24
- Морозов И.А., Годовалов А.П., Баяндина С.Г.** Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию иммуноглобулинов класса G в культуре мононуклеарных лейкоцитов практически здоровых доноров..... 34
- Саркисян Н.С., Куличенко А.Н., Калашникова М.В., Ковалевич Н.И.** Анализ уровня цитокинов у больных острым бруцеллёзом в оценке системного воспаления..... 38
- Керимов Т.З., Борзенко С.А., Гаврилова Н.А., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Соболев В.П.** Стимуляция естественных механизмов противовирусной защиты в донорской роговице человека на этапе консервации..... 45

## ОБЗОРЫ

- Осиков М.В., Шеломенцев А.В., Шишкова Ю.С.** Роль оси «микробиота – кишечник – головной мозг» в патогенезе ишемического инсульта..... 52
- Рыкунова А.Я., Зверев Я.Ф.** Современные представления о патогенеза ревматоидного артрита..... 59
- Кузнецов М.С., Михайличенко М.И., Красильников А.А.** Некоторые особенности адаптивного иммунитета у пациентов с перитонитом..... 71

## ХРОНИКА

- Кубышкин А.В., Захарьян Е.А., Коваленко Е.П.** Воспаление как характеристика здоровья и болезни: как найти баланс? (Информация о 16-м Всемирном конгрессе по воспалению (WCI2024))..... 80

## ЮБИЛЕИ

- К 80-летию со дня рождения Валерия Александровича Черешнева..... 85

## ORIGINAL ARTICLES

- Selezneva Al.D., Lukina S.S., Selezneva An.D., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Merkulova D.M., Burdennyy A.M., Braga E.A., Loginov V.I.** Changes in methylation of a group of apoptosis-associated protein-coding genes and long non-coding RNA genes as a factor of dysregulation of their expression in breast cancer
- Momot A.P., Vdovin V.M., Shakhmatov I.I.** Comparative analysis of thrombotic safety by using tranexamic acid and a fibrin monomer during the antiplatelet or fibrinolytic therapy in experiment
- Basharin V.A., Chepur S.V., Shchegolev A.V., Kharitонов M.A., Tolkach P.G., Yaroshenko D.M., Arsentev L.V., Gracheva G.U., Ilatovskaya Yu.D.** Experimental evaluation of the effectiveness of respiratory support for the correction of toxic pulmonary edema
- Morozov I.A., Godovalov A.P., Bayandina S.G.** The effect of bacterial polyamines on the production of the class G immunoglobulins in the culture of mononuclear leukocytes from healthy donors
- Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N., Kalashnikova M.V., Kovalevich N.I.** Analysis of cytokine concentrations in patients with acute brucellosis in the assessment of systemic inflammation
- Kerimov T.Z., Borzenok S.A., Gavriloва N.A., Ostrovsky D.S., Khubetsova M.Kh., Sobolev V.P.** Stimulation of innate immune mechanisms in human donor corneas

## REVIEWS

- Osikov M.V., Shelomentsev A.V., Shishkova Yu.S.** The role of the microbiota-gut-brain axis in the pathogenesis of ischaemic stroke
- Rykunova A.Ya., Zverev Ya.F.** Modern concepts of the pathogenesis of rheumatoid arthritis
- Kuznetsov M.S., Mikhaylichenko M.I., Krasilnikov A.A.** Features of adaptive immunity in patients with peritonitis

## INFORMATION

- Kubyshkin A.V., Zakharyan E.A., Kovalenko E.P.** Inflammation in health and disease: a balancing act (information about the 16<sup>th</sup> World Congress on Inflammation (WCI2024))

## ANNIVERSARY

- Dedicated to the 80<sup>th</sup> Anniversary of Valery Alexandrovich Chereshev

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2024

УДК 575:599.9

Селезнева Ал.Д.<sup>1</sup>, Лукина С.С.<sup>1</sup>, Селезнева Ан.Д.<sup>1</sup>, Пронина И.В.<sup>1,2</sup>, Меркулова Д.М.<sup>6</sup>,  
Казубская Т.П.<sup>3</sup>, Бурдённый А.М.<sup>1,4</sup>, Брага Э.А.<sup>1,5</sup>, Логинов В.И.<sup>1,5</sup>

### Изменение метилирования группы апоптоз-ассоциированных белок-кодирующих генов и генов длинных некодирующих РНК как фактор в нарушении их экспрессии при раке молочной железы

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Государственный университет просвещения»,  
141014, Московская область, Мытищи, Россия, ул. Веры Волошиной, д. 24;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

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

<sup>5</sup>ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова,  
115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;

<sup>6</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России  
(Сеченовский Университет),  
119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, Россия

**Предпосылки и цели.** Настоящее исследование было направлено на изучение роли изменений уровня метилирования ДНК и экспрессии мРНК белок-кодирующих генов внутренней системы апоптоза *APAF1*, *BAX* и *BIM* и генов длинных некодирующих РНК (днРНК) *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1* в возникновении и прогрессии рака молочной железы (РМЖ), а также проведение анализа кометилирования и коэкспрессии представителей этих двух групп генов.

**Методика.** Анализ уровня метилирования проводился методом количественной метил-специфичной ПЦР в реальном времени на выборке из 47 парных (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцов РМЖ. Для оценки уровня экспрессии проводили реакцию обратной транскрипции с последующей амплификацией кДНК с помощью SYBR Green ПЦР в реальном времени. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

**Результаты.** Показано статистически значимое увеличение уровня метилирования всех исследуемых генов и статистически значимое снижение уровня экспрессии генов *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* в опухолевой ткани молочной железы. Выявлены статистически значимые ассоциации уровня метилирования генов *BAX*, *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* со стадией, гена *HAND2-AS1* – с размером опухоли, гена *BIM* – с наличием метастазов в лимфатических узлах. Также продемонстрирована связь между изменением уровня экспрессии генов *BIM* и *APAF1* и показателями прогрессии РМЖ (стадией и размером опухоли). Показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением статуса метилирования промоторных CpG-островков генов *APAF1*, *BAX* и *ADAMTS9-AS2* и изменением уровня их экспрессии. Обнаружено кометилирование генов: *ADAMTS9-AS2* – *BIM/APAF1/BAX* и *HAND2-AS1* – *BAX* и ко-экспрессия генов *ADAMTS9-AS2* – *BAX*.

**Заключение.** Полученные данные могут быть использованы для обоснования применения исследуемых в работе генов в качестве маркеров для диагностики и прогноза РМЖ.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК; апоптоз-ассоциированные белок-кодирующие гены; длинные некодирующие РНК; рак молочной железы

**Для цитирования:** Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Селезнева Ан.Д., Пронина И.В., Меркулова Д.М., Казубская Т.П., Бурдённый А.М., Брага Э.А., Логинов В.И. Изменение метилирования группы апоптоз-ассоциированных белок-кодирующих генов и генов длинных некодирующих РНК как фактор в нарушении их экспрессии при раке молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(4): 4–13.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.4-13

**Участие авторов:** обработка материала, проведение исследования – Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Селезнева Ан.Д., Пронина И.В.; статистическая обработка результатов, написание текста – Селезнева Ал.Д.; сбор и описание материала – Казубская Т.П.; подготовка иллюстративного материала – Бурдённый А.М.; написание текста, редактирование статьи – Брага Э.А., Логинов В.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: **Бурдённий Алексей Михайлович**, e-mail: burdenny@gmail.com;

**Логинов Виталий Игоревич**, e-mail: loginov7w@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет средств Государственного Задания, №. FGFU-2022-0007.

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

Поступила 06.08.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

**Selezneva A.I.<sup>1</sup>, Lukina S.S.<sup>1</sup>, Selezneva An.D.<sup>1</sup>, Pronina I.V.<sup>1,2</sup>, Merkulova D.M.<sup>6</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>3</sup>,  
Burdenny A.M.<sup>1,4</sup>, Braga E.A.<sup>1,5</sup>, Loginov V.I.<sup>1,5</sup>**

## Changes in methylation of a group of apoptosis-associated protein-coding genes and long non-coding RNA genes as a factor of dysregulation of their expression in breast cancer

<sup>1</sup>Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,

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

<sup>2</sup>State University of Education, Faculty of Natural Sciences, Department of Physiology, Human Ecology and Biomedical Knowledge,  
24 Very Voloshinoy st., Moscow region, Mytishchi, 141014, Russian Federation;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, 23 Kashirskoye highway, Moscow,  
115478, Russian Federation;

<sup>4</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,

4 Kosygina st., Moscow, 119334, Russian Federation;

<sup>5</sup>Research Centre for Medical Genetics,

1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation;

<sup>6</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare  
of the Trubetskaya ul., 119991 Moscow, Russian Federation

**Background and aims.** This study focused on the role of changes in DNA methylation and mRNA expression of protein-coding genes of the intrinsic apoptosis system *APAF1*, *BAX*, and *BIM*, and long non-coding RNA (lncRNA) genes *ADAMTS9-AS2* and *HAND2-AS1* in the emergence and progression of breast cancer (BC), as well as on the analysis of co-methylation and co-expression of representatives from these two gene groups.

**Methods.** Analysis of methylation level was performed by quantitative methyl-specific real-time PCR on a sample of 47 paired (tumor/adjacent histologically normal breast tissue) BC specimens. The expression levels were evaluated by reverse transcription followed by cDNA amplification using SYBR Green real-time PCR. The significance of differences between the studied groups was assessed with the non-parametric Mann–Whitney test for independent samples. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

**Results.** The methylation level of all studied genes was significantly increased whereas the expression level of *APAF1* and *ADAMTS9-AS2* genes was significantly decreased in breast tumor tissue. Significant associations were found between the methylation level of *BAX*, *APAF1*, *HAND2-AS1*, and *ADAMTS9-AS2* genes with stage, *HAND2-AS1* gene with tumor size, and *BIM* gene with the presence of lymph node metastases. The study also demonstrated an association between changes in the expression level of *BIM* and *APAF1* genes and BC progression indicators (stage and tumor size). A significant negative correlation was shown between changes in the methylation status of promoter CpG islands of *APAF1*, *BAX*, and *ADAMTS9-AS2* genes and changes in their expression levels. Co-methylation of *ADAMTS9-AS2* – *BIM/APAF1/BAX* and *HAND2-AS1* – *BAX* genes, and co-expression of *ADAMTS9-AS2* – *BAX* genes were detected.

**Conclusion.** The obtained results can justify the use of the studied genes as markers for BC diagnosis and prognosis.

**Keywords:** DNA methylation; apoptosis-associated protein-coding genes; long non-coding RNAs; breast cancer

**For citation:** Selezneva A.I., Lukina S.S., Selezneva An.D., Pronina I.V., Merkulova D.M., Kazubskaya T.P., Burdenny A.M., Braga E.A., Loginov V.I. Changes in methylation of a group of apoptosis-associated protein-coding genes and long non-coding RNA genes as a factor of dysregulation of their expression in breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 4–13. (in Russian)  
DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.4-13

**Authors' contributions:** material processing, research conduction – Selezneva A.I., Lukina S.S., Selezneva An.D., Pronina I.V.; statistical processing of results, writing the text – Selezneva A.I.; material collection and description – Kazubskaya T.P.; preparation of illustrative material – Burdenny A.M.; writing the text, editing the text – Braga E.A., Loginov V.I. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** **Alexey M. Burdenny**, e-mail: burdenny@gmail.com; **Vitaly I. Loginov**, e-mail: loginov7w@gmail.com

### Information about the authors:

Selezneva A.I., <https://orcid.org/0009-0001-5472-8879>

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

Selezneva An.D., <https://orcid.org/0009-0000-0741-3965>

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

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

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

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

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

**Financing.** The study was carried out at the expense of the State Assignment, No. FGFU-2022-0007.

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

Received 06.08.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Результаты оценки числа новых случаев рака, а также количества смертей от различных злокачественных новообразований, предоставляемые Международным агентством по изучению рака IARC (*International Agency for Research on Cancer*), свидетельствуют о том, что онкологические заболевания по-прежнему входят в перечень основных проблем системы общественного здравоохранения. По данным на 2020 г. первую строчку в рейтинге наиболее часто диагностируемых во всем мире видов рака женской репродуктивной системы занимает рак молочной железы (РМЖ). Этот вид злокачественных новообразований был выявлен у не менее чем 2,26 млн женщин (11,7% от общего числа случаев рака) и унёс жизни более 680 000 пациенток (6,9% от общего числа смертей от рака) [1]. Приведённые выше неутешительные цифры обуславливают необходимость совершенствования существующих и создание новых систем скрининга и подходов к лечению РМЖ.

Фундаментальные исследования механизмов канцерогенеза при РМЖ и других злокачественных новообразованиях дают основания утверждать, что одним из ключевых событий в процессе опухолевой трансформации эпителиальных клеток молочной железы являются аномальные эпигенетические изменения [2]. К ним в первую очередь относится снижение или повышение уровня метилирования промоторных CpG-островков белок-кодирующих (БКГ) и регуляторных генов, следствием чего может быть их aberrantная экспрессия.

Среди множества БКГ, изменение экспрессии которых отмечено при многих злокачественных новообразованиях, нами изучены гены, участвующие в инициации и реализации внутреннего пути апоптоза (генетически детерминированного процесса клеточной гибели), в частности *BAX*, *BIM* и *APAF1*. Ген *BAX* кодирует проапоптотический белок с одноименным названием, который непосредственно участвует в образовании пор во внешней митохондриальной мембране, вследствие чего происходит увеличение её проницаемости. Ген *BIM* в свою очередь кодирует белок, регулирующий активность *BAX*, оказывая на него активирующее действие. Кроме того, он обладает способностью взаимодействовать с антиапоптотическими членами семейства *BCL2*, тем самым инактивируя их и способ-

ствуя гибели клетки [3]. Продукт гена *APAF1* участвует в образовании особого молекулярного комплекса — апоптосомы, а также активации каспазы-9 [4]. Выбор системы генов для изучения обусловлен тем, что при развитии и прогрессии злокачественных новообразований в большинстве случаев наблюдается тенденция в изменении уровня экспрессии апоптоз-ассоциированных белков. Так, количество проапоптотических белков, способствующих гибели клетки, снижается, а уровень антиапоптотических белковых молекул, ингибирующих этот процесс, наоборот возрастает.

Другой обширной группой генов, aberrantная экспрессия которых характерна для многих видов рака, являются гены некодирующих РНК, включая большую гетерогенную группу генов, кодирующих не белковый продукт, а транскрипты длиной свыше 200 нуклеотидов и называемые длинные некодирующие РНК (днРНК). Многообразие механизмов действия этих молекул определяет их способность изменять экспрессию генов, участвующих в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза, миграции, инвазии и многих других на транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях реализации генетической информации. Результаты исследований, выполненных на клеточных линиях и образцах различных видов рака, свидетельствуют о неоднозначной роли днРНК в процессе онкогенеза: одна и та же молекула днРНК может проявлять онкогенные свойства при одних условиях и онкосупрессорные — при других [5]. Исследуемые в настоящей работе гены днРНК *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1* играют роль генов-супрессоров опухолевого роста при развитии большинства злокачественных новообразований. Так, было показано, что при раке пищевода днРНК *ADAMTS9-AS2* способствует ингибированию пролиферации, инвазии и миграции клеток опухоли путём связывания и привлечения ДНК-метилтрансферазы к промотору онкогена *CDH3* [6]. Результаты другого исследования свидетельствуют о том, что подавление прогрессирования колоректального рака при участии днРНК *HAND2-AS1* обеспечивается её способностью функционировать как конкурентная эндогенная РНК (ceRNA), связывающая miR-1275, мишенью которой является мРНК гена *KLF14* [7].

На основании вышеизложенного можно заключить, что анализ метилирования белок-кодирующих и регуляторных генов, а также изучение роли этого процесса в изменении их экспрессии вероятно позволит идентифицировать новые маркеры с высоким диагностическим и прогностическим потенциалом. Кроме того, анализ кометилирования и коэкспрессии апоптоз-ассоциированных БКГ и генов днРНК может помочь в обнаружении возможных взаимодействий молекул, участвующих в реализации сигнальных каскадов, играющих ключевую роль в злокачественной трансформации клеток при РМЖ.

Целью данной работы было изучение роли изменений уровня метилирования ДНК и экспрессии мРНК группы БКГ системы апоптоза (*APAF1*, *BAX*, *BIM*) и генов днРНК (*ADAMTS9-AS2*, *HAND2-AS1*) в возникновении и прогрессии РМЖ, а также анализ кометилирования и коэкспрессии представителей этих двух групп генов.

### Методика

Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы операционного материала от 47 пациенток, клинико-морфологические характеристики которых представлены в **таблице 1** (в том числе 42 инфильтративно-протокового и 5 инфильтративно-долькового РМЖ), получали в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президен-

та РФ от 24.12.93 № 2288) и с разрешения локального этического комитета института ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» на основании соглашения от 20.01.2020 № 20/1 о взаимном сотрудничестве с ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Одним из критериев использования резекционной ткани в исследовании являлось отсутствие воздействия на больных лучевой, гормональной или химиотерапии до момента проведения операции. Клиническую классификацию всех случаев рака молочной железы проводили в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002 г.), гистологическое описание осуществляли на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в отделе патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [8]. Отобранные образцы ткани помещали в жидкий азот и далее хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в низкотемпературном холодильнике.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из опухолевой и парной гистологически нормальной ткани молочной железы по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. Для определения концентрации и оценки чистоты выделения ДНК измеряли оптическую плотность на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Далее проводили бисульфитную конверсию ДНК в растворе с последующей очисткой, после чего для оценки уровня метилирования исследуемых генов модифицированную ДНК использовали в качестве матрицы при проведении количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ). Амплификацию проводили в 96-луночных

Таблица 1/Table 1

### Клинико-морфологические параметры больных раком молочной железы

#### Clinical and morphological parameters of patients with breast cancer

Клинико-патологический параметр		N (%)
Стадия опухолевого процесса	I	11 (23.4%)
	II	25 (53.2%)
	III	11 (23.4%)
Размер первичной опухоли	T1	12 (25.5%)
	T2	28 (59.6%)
	T3	3 (6.4%)
	T4	4 (8.5%)
Лимфогенное метастазирование	N0	21 (44.7%)
	N1-3	26 (55.3%)

планшетах «Optical Reaction Plate» с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System («BioRad», США) в соответствии с протоколом производителя. Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига (Тотж) и размеры продукта МС-ПЦР-РВ для генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* взяты из [9], для генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *HAND2-AS1* – приведены в **таблице 2**, а для контрольного локуса АСТВ1 взяты из [10]. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 («Promega», США). В качестве положительного контроля 100%-ого метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 («Thermo Fisher Scientific»). Более подробно описано в [11].

Помимо геномной ДНК из 20 парных биологических образцов РМЖ методом гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции была выделена суммарная РНК [11]. Качество и концентрацию выделенной РНК определяли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов выделенную РНК использовали для

проведения реакции обратной транскрипции. Синтез первой цепи кДНК проводили в амплификаторе «T100 Thermal Cycler» («Bio-Rad», США) с использованием набора реактивов MMLV RT kit # SK021 («Евроген», Россия). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР в режиме реального времени по технологии SYBR Green. Амплификацию проводили в 96-луночных планшетах «Optical Reaction Plate» с использованием набора 5x qPCR mix-HS SYBR в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System («Bio-Rad», США). Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига (Тотж) для белок-кодирующих генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем, относительно которого и проводили нормирование продуктов амплификации исследуемых генов, взяты из работ [12, 13], а для генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *HAND2-AS1* приведены в **таблице 2**. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК.

Результаты ПЦР в реальном времени были проанализированы по методу определения величины  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [14]. Все эксперименты повторяли трижды.

Таблица 2/Table 2

**Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры ПЦР**  
**Nucleotide sequences of primers and PCR parameters**

Название гена	Последовательность олигонуклеотидов	Т <sub>отж</sub> , °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
<b>МС-ПЦР-РВ</b>			
<i>ADAMTS9-AS2</i>	MF: AATTTTCGATAGCGTATTTTCGGGAGTTAC	60	187
	MR: TCTTAAATTCCTCAAACACATCCTTCCT		
	UF: TTTTGATAGTGATTTTGGGAGTTATGG	60	238
	UR: AATACTCACCCCAAACACTAAACTACT		
<i>HAND2-AS1</i>	MF: CGAGGTTGGTACGCGGAG	60	121
	MR: CCGACACAACATAAACCGACTC		
	UF: TGGGGTTTTTGTGAGGTTGGTATGT	60	134
	UR: CCCCACACAACATAAACCAACTCCTC		
<b>ПЦР-РВ</b>			
<i>ADAMTS9-AS2</i>	F: CTCCACCCGATCCTTCCATTGA R: GGGGGTCTTGCTCTTTCCTTATCC	60	199
<i>HAND2-AS1</i>	F: CCCCGAATCTGTAGTGTGGC R: CAGGCGGTGGAGAGGACT	59	113

**Примечание.** \* – все олигонуклеотиды, были подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <https://www.urogene.org/methprimer2/> с дополнительной проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ LaserGene 17.1 компании DNASTAR (США).

**Note.** \* – all oligonucleotides were selected using the database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> and the program <https://www.urogene.org/methprimer2/> with additional verification in the SeqBuilder Pro program, which is part of the LaserGene 17.1 software package from DNASTAR (USA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 29, включая определение медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Для оценки достоверности различий уровней метилирования и экспрессии исследуемых генов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для исследования влияния метилирования исследуемых генов на их экспрессию, а также анализа коэкспрессии и кометилирования БКГ и генов днРНК рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

### Результаты и обсуждения

Гены длинных некодирующих РНК и белок-кодирующие гены, продукты которых предположительно участвуют в развитии и прогрессии рака молочной железы, были отобраны на основании анализа интернет-источников и данных литературы в соответствии с двумя критериями: наличие CpG-островка, локализованного в пределах 2000 п.н. от 5' конца гена днРНК или БКГ, и наличие данных об изменении уровня метилирования БКГ или гена днРНК в эпителиальных опухолях каких-либо локализаций. В итоге в исследование было включено 3 БКГ: *APAF1*, *BAX* и *BIM* и 2 гена днРНК: *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1*.

Было обнаружено статистически значимое увеличение уровня метилирования всех исследуемых БКГ и генов днРНК в опухолевых образцах по сравнению с парной гистологически нормальной тканью, что может указывать на онкосупрессорную роль продуктов этих генов и их вовлеченность в патогенез РМЖ. Значения медианы (Me), а также межквартильного размаха (Q1–Q3) уровня метилирования исследуемых генов приведены в **таблице 3**.

В более ранних исследованиях было продемонстрировано гиперметилирование промоторной области генов *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* при РМЖ [15, 16]. Кроме того, данные о повышении уровня метилирования генов *BAX*, *BIM* и *HAND2-AS1* в опухолевой ткани по сравнению с гистологически нормальной прилежащей тканью согласуются с результатами исследований, выполненных в других выполненных на биологических образцах пациентов с другими онкологическими заболеваниями разных локализаций [13, 17, 18].

Данные об изменении метилирования исследуемых генов в образцах РМЖ были сопоставлены с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *BAX*, *APAF1*, *HAND2-AS1* и *ADAMTS9-AS2* на III стадии РМЖ по сравнению с более ранними стадиями (I–II) (**рис. 1, а/а**). Также продемонстрировано, что уровень метилирования гена *HAND2-AS1* статистически значимо выше в образцах с большим размером опухоли (T3/T4 против T1/T2) (**рис. 1, б/б**). Кроме того, статистически значимо высокий уровень метилирования гена *BIM* был связан с наличием метастазов в лимфатических узлах (N1-3 против N0) (**рис. 1, в/в**).

Результаты анализа профиля экспрессии исследуемых БКГ и генов днРНК в 20 парных образцах РМЖ показали снижение уровня экспрессии 2 из 5 исследуемых генов (*APAF1* и *ADAMTS9-AS2*) в опухолевой ткани молочной железы в сравнении с гистологически неизменной нормой (**рис. 2, а/а**). В более ранних зарубежных исследованиях также была отмечена aberrantная экспрессия данных генов при РМЖ [15, 16].

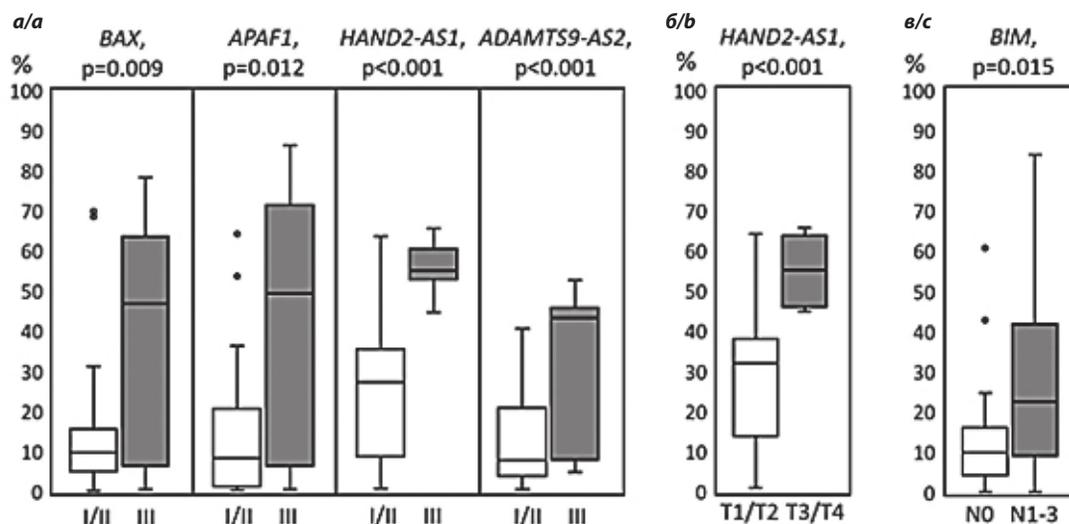
Данные об изменении экспрессии исследуемых генов в образцах РМЖ были сопоставлены с клинико-морфологическими характеристиками опухолей. Было выявлено статистически значимое снижение

Таблица 3/Table 3

**Значения уровня метилирования белок-кодирующих генов системы внутреннего пути апоптоза и генов днРНК в образцах РМЖ и прилежащей гистологически нормальной ткани молочной железы**

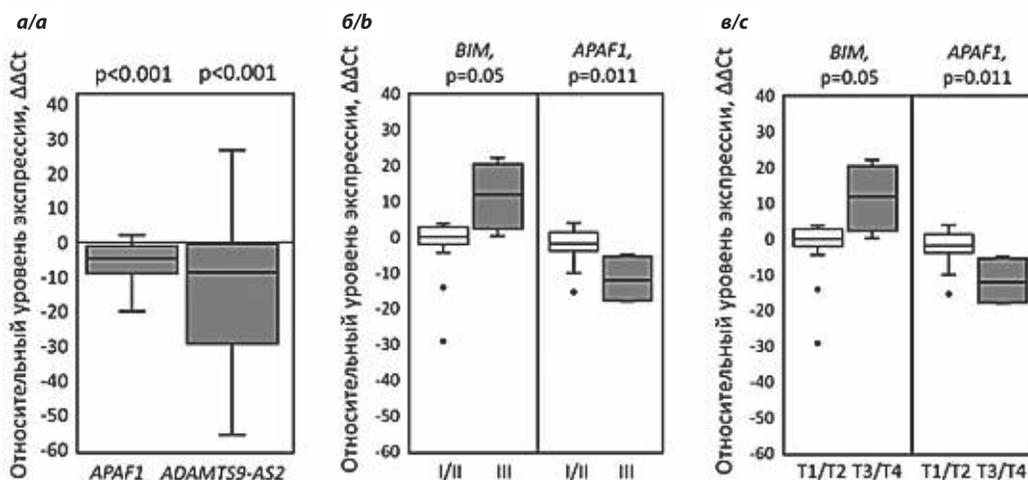
**Methylation levels of protein-coding genes of the intrinsic apoptotic pathway system and lncRNA genes in breast cancer samples and adjacent histologically normal breast tissue**

Название гена	<i>p</i>	Me (Q1-Q3)	
		Опухоль	Норма
<i>BIM</i>	<0.001	13.67 (6.22–33.74)	4.15 (0.33–13.50)
<i>BAX</i>	0.038	10.16 (5.33–27.45)	7.32 (4.27–12.42)
<i>APAF1</i>	<0.001	9.18 (1.29–32.17)	1.90 (0.75–5.16)
<i>HAND2-AS1</i>	<0.001	33.10 (18.65–45.91)	3.46 (1.76–7.70)
<i>ADAMTS9-AS2</i>	<0.001	11.34 (4.56–28.57)	4.58 (2.48–8.21)



**Рис. 1.** Связь уровня метилирования белок-кодирующих генов системы апоптоза и генов днРНК со стадией онкологического процесса – а, размером опухоли – б и лимфогенным метастазированием – в. Нижняя и верхняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют первому и третьему квартилям (внутри прямоугольника попадает 50% наблюдений). Линия внутри прямоугольника соответствует медиане (Me). Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечены максимальное и минимальное значения, которые не являются выбросами. Выбросы (значения, отличающиеся от межквартильного размаха более, чем в полтора раза) отмечены кружками. Ось Y – уровень метилирования, %; ось X – анализируемые группы.

**Fig. 1.** The relationship between the methylation level of protein-coding genes of the apoptosis system and lncRNA genes with the stage of the oncological process – a, tumor size – b and lymphogenous metastasis – c. The lower and upper boundaries of the rectangles in the diagrams correspond to the first and third quartiles (50% of observations fall inside the rectangle). The line inside the rectangle corresponds to the median (Me). The lines above and below the rectangles mark the maximum and minimum values, which are not outliers. Outliers (values differing from the interquartile range by more than one and a half times) are marked with circles. Y-axis – methylation level, %; X-axis – analyzed groups.



**Рис. 2.** Результаты анализа экспрессии белок-кодирующих генов системы апоптоза *APAF1*, *BIM* и гена днРНК *ADAMTS9-AS2*. а – диаграммы размаха значений уровня экспрессии мРНК гена *APAF1* и днРНК *ADAMTS9-AS2* при РМЖ, выраженных в значениях ΔΔCt; б – связь уровня экспрессии мРНК генов *APAF1*, *BIM* со стадией онкологического процесса; в – связь уровня экспрессии мРНК генов *APAF1*, *BIM* с размером опухоли.

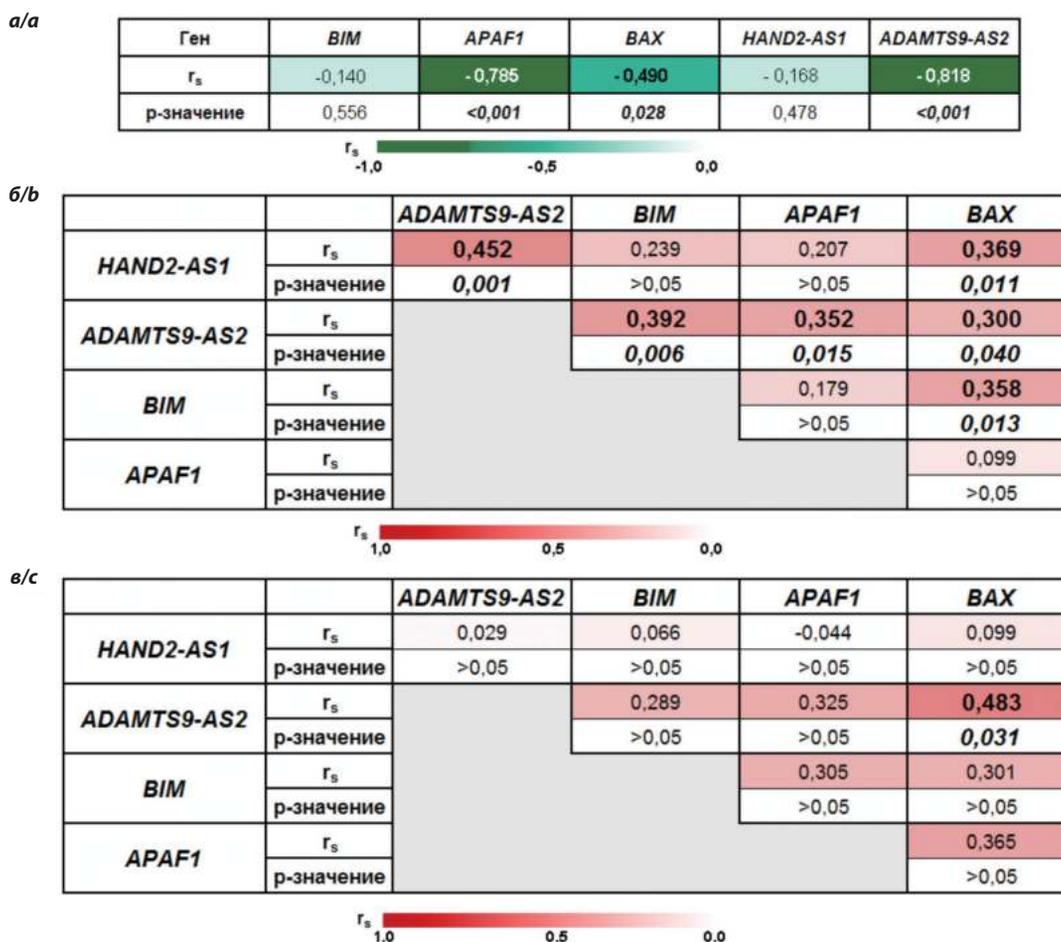
**Fig. 2.** Results of the expression analysis of *APAF1*, *BIM* the apoptosis system protein-coding genes and the *ADAMTS9-AS2* lncRNA gene. а – diagrams of the range of the expression levels of *APAF1* mRNA and *ADAMTS9-AS2* lncRNA in breast cancer, expressed in ΔΔCt values; б – the relationship between the level of mRNA expression of the genes *APAF1*, *BIM* with the stage of the oncological process; в – the relationship between the level of mRNA expression of the genes *APAF1*, *BIM* with the tumor size.

уровня экспрессии гена *APAF1* на III стадии РМЖ по сравнению с более ранними стадиями (I–II), а также в образцах с большим размером опухоли (T1/T2 против T3/T4) (рис. 2, б/б, в/с). При этом для гена *BIM* ситуация была ровно противоположной: на более поздних стадиях заболевания и в опухолях молочной железы большего размера наблюдалось увеличение уровня его экспрессии (рис. 2, б/б, в/с).

Ассоциации между изменением уровня экспрессии и наличием метастазов в лимфатических узлах ни для одного из исследуемых генов показано не было. В литературе встречаются единичные работы, которые косвенно подтверждают полученные нами экспериментальные данные о связи уровня экспрессии гена *APAF1* со стадией РМЖ и размером опухоли. Так, в ра-

боте В.К. Ahn и соавт. была выявлена ассоциация между снижением уровня экспрессии гена *APAF1* и клинико-патологическими характеристиками опухолей при колоректальном раке [19]. В то же время исследования, выполненные на других видах рака показывают отличную от выявленной нами связь между изменением уровня экспрессии гена *BIM* и показателями прогрессии РМЖ, что может указывать на разные механизмы действия и разную роль продукта данного гена в прогрессии различных онкологических заболеваний [13, 20].

С использованием коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ) была показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением уровня метилирования промоторных CpG-островков ге-



**Рис. 3.** Ассоциация изменения уровней экспрессии с уровнями метилирования исследуемых белок-кодирующих генов *APAF1*, *BAX* и *BIM* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2* и *HAND2-AS1* – а; кометилирование – б; коэкспрессия – в;  $r_s$  – коэффициент корреляции Спирмена; статистически значимые корреляции выделены жирно курсивом ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 3.** Association of changes in expression levels with methylation levels of the studied protein-coding genes *APAF1*, *BAX* and *BIM* and lncRNA genes *ADAMTS9-AS2* and *HAND2-AS1* – a; comethylation – b; coexpression – c;  $r_s$  – Spearman correlation coefficient; statistically significant correlations are highlighted in bold italics ( $p \leq 0.05$ ).

нов *APAF1*, *BAX* и *ADAMTS9-AS2* и изменением уровня их экспрессии (рис. 3, а/а), что указывает на роль aberrантного метилирования данных генов в нарушении их экспрессии при РМЖ. Полученные нами результаты оценки влияния метилирования промоторных областей генов *APAF1* и *ADAMTS9-AS2* на их экспрессию находят подтверждение в более ранних работах [15, 16], при этом связь между снижением уровня экспрессии гена *BAX* и гиперметилированием его промоторного CpG-островка на репрезентативной выборке образцов РМЖ показана впервые.

Данные по изменению уровня метилирования исследуемых БКГ были сопоставлены с данными по изменению уровня метилирования генов днРНК. С использованием коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ) была показана статистически значимая положительная корреляция между уровнем метилирования промоторных CpG-остроек генов *BIM* и *ADAMTS9-AS2*, *APAF1* и *ADAMTS9-AS2*, а также *BAX* и *HAND2-AS1*, *ADAMTS9-AS2* (рис. 3, б/б). Кроме того, нами был проведен анализ коэкспрессии исследуемых БКГ и генов днРНК. В результате была показана положительная корреляция между уровнем экспрессии мРНК гена *BAX* и днРНК *ADAMTS9-AS2* (рис. 3, в/в), что может указывать на возможное опосредованное взаимодействие между ними, это косвенно подтверждается рядом исследований, раскрывающих механизмы действия днРНК, в частности продемонстрировавших их способность действовать как «губка» (sponge) для молекул микроРНК [21]. Стоит отметить, что однонаправленное изменение уровня экспрессии этих генов ранее было отмечено при раке печени, при этом подобные данные на образцах РМЖ получены впервые [22].

### Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что метилирование белок-кодирующих генов *BIM*, *BAX* и *APAF1*, а также генов днРНК *HAND2-AS1* и *ADAMTS9-AS2* вовлечено в возникновение и прогрессию РМЖ, а изменение уровня метилирования в промоторных областях генов *APAF1*, *BAX* и *ADAMTS9-AS2* играет главную роль в нарушении их экспрессии. Кроме того, в нашей работе отмечено кометилирование генов *BIM – ADAMTS9-AS2*, *APAF1 – ADAMTS9-AS2*, *BAX – HAND2-AS1 / ADAMTS9-AS2* и коэкспрессия генов *BAX – ADAMTS9-AS2*, указывающая на возможное опосредованное взаимодействие продуктов этих генов. Полученные данные расширяют представления о роли изменений уровня метилирования и экспрессии исследуемых генов в процессе онкогенеза при РМЖ и указывают на возможность их ис-

пользования в качестве биомаркеров для диагностики и прогноза течения заболевания, а также в качестве мишеней для противоопухолевой терапии. Стоит отметить, что для формулировки окончательных выводов необходимо воспроизведение полученных нами результатов на выборке, включающей большее количество образцов.

### Литература

#### (п.п. 1-2; 4-8; 10; 12; 14-22 см. References)

3. Сеничкин В.В., Первущин Н.В., Зуев А.П., Животовский Б., Копейна Г.С. Таргетирование белков семейства Bcl-2: что, где, когда? *Биохимия*, 2020; 85(10): 1421–41. <https://doi.org/10.31857/S0320972520100097>
9. Брага Э.А., Бурденный А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Фридман М.В. и др. Система маркеров на основе метилирования группы проапоптотических генов в комбинации с микроРНК в диагностике рака молочной железы. *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.* 2019; 168(9): 338–42. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04710-2>
11. Филиппова Е.А. *Аномальная экспрессия и aberrантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников*: Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. М.; 2020.
13. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хохлова С.В., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов апоптоза при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(4): 5–12. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.5-12>

### References

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74(3): 229–63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>. 38572751
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022; 12(1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
3. Senichkin V.V., Pervushin N.V., Zuev A.P., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. Targeting Bcl-2 Family Proteins: What, Where, When? *Biochemistry (Mosc)*. 2020; 85(10): 1210–26. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S0320972520100097>
4. Yuan S., Akey C.W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*. 2013; 21(4): 501–15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
5. Zhang X., Wang W., Zhu W., Dong J., Cheng Y., Yin Z., et al. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(22): 5573. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>
6. Liu D., Wu K., Yang Y., Zhu D., Zhang C., Zhao S. Long noncoding RNA ADAMTS9-AS2 suppresses the progression of esophageal cancer by mediating CDH3 promoter methylation. *Mol. Carcinog.* 2020; 59(1): 32–44. <https://doi.org/10.1002/mc.23126>
7. Zhou J., Lin J., Zhang H., Zhu F., Xie R. LncRNA HAND2-AS1 sponging miR-1275 suppresses colorectal cancer progression by up-regulating KLF14. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 503(3): 1848–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.125>

8. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *Union for International Cancer Control (UICC). TNM classification of malignant tumors, 8<sup>th</sup> edn.* Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2017.
9. 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(3): 366-70. (In Russian). <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04710-2>
10. 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>
11. Filippova E.A. *Abnormal expression and aberrant methylation of genes and microRNAs associated with apoptosis in the pathogenesis of the mammary gland and ovaries*: Dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences. Moscow; 2020. (In Russian)
12. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene.* 2017; 604: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>
13. Gubenko M.S., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., et al. DNA methylation in regulation of the apoptosis gene expression in non-small cell lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(4): 5-12. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.5-12> (in Russian)
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
15. Eskandari-Nasab E., Hashemi M. Promoter Methylation and mRNA Expression of APAF-1 Gene in Breast Cancer. *Gene Cell Tissue.* 2017; 4(1): e13332. <https://doi.org/10.17795/gct-43748>
16. Deva Magendhra Rao A.K., Patel K., Korivi Jyothiraj S., Meenakumari B., Sundersingh S., Sridevi V., et al. Identification of lncRNAs associated with early-stage breast cancer and their prognostic implications. *Mol Oncol.* 2019; 13(6): 1342-55. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12489>
17. Mhaidat N.M., Al Sheyab F.M., Zyoud A.M., Alzoubi K.H., Khabour O.F., AL-Quraan N.A., et al. Study the epigenetic down-regulation of Bim on colorectal cancer chemotherapy response. *Journal of King Saud University-Science.* 2019; (31): 308-13. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.09.012>
18. Samadi P., Shahnazari M., Shekari A., Maghool F., Jalali A. A pan-cancer analysis indicates long noncoding RNA HAND2-AS1 as a potential prognostic, immunomodulatory and therapeutic biomarker in various cancers including colorectal adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* 2023; 23(1): 307. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03163-7>
19. Ahn B.K., Kim S.H., Paik S.S., Lee K.H. Loss of APAF-1 expression is associated with early recurrence in stage I, II, and III colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2016; 401(8): 1203-10. <https://doi.org/10.1007/s00423-016-1483-3>
20. Yuan H., Tu S.L., He X.J. Relationship between PUMA and BIM expression in colorectal cancer and tumor invasion, metastasis and prognosis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2013; 51(6): 547-51. (in Chinese)
21. Wang A., Jin C., Li H., Qin Q., Li L. LncRNA ADAMTS9-AS2 regulates ovarian cancer progression by targeting miR-182-5p/FOXF2 signaling pathway. *Int J Biol Macromol.* 2018; 120(Pt B): 1705-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.179>
22. Li H., Huang H., Li S., Mei H., Cao T., Lu Q. Long non-coding RNA ADAMTS9-AS2 inhibits liver cancer cell proliferation, migration and invasion. *Exp Ther Med.* 2021; 21(6): 559. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9991>

**Сведения об авторах:**

**Селезнева Алена Дмитриевна**, лаборант-исследователь, лаб. патогеномики и транскриптомики

ФГБНУ НИИОПП;

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

**Селезнева Анна Дмитриевна**, лаборант-исследователь, лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Пронина Ирина Валерьевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики

ФГБНУ НИИОПП;

**Меркулова Дина Мироновна**, доктор мед. наук, проф. каф. нервных болезней, руководитель неврологического центра, e-mail: dinamerkl@mail.ru;

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

**Бурдённий Алексей Михайлович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Брага Элеонора Александровна**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Логинов Виталий Игоревич**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616.151.5:616-092-005.1-08:615.273:616-092.9

Момот А.П.<sup>1,2</sup>, Вдовин В.М.<sup>1</sup>, Шахматов И.И.<sup>1</sup>

## Сравнительный анализ тромбобезопасности при использовании транексамовой кислоты и фибрин-мономера на фоне антиагрегантной или фибринолитической терапии в эксперименте

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, Барнаул, Россия, пр. Ленина, д. 40;

<sup>2</sup>Алтайский филиал ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 656045, Барнаул, Россия, ул. Ляпидевского, д. 1/2

**Введение.** Тяжелая кровопотеря нередко ведет к смерти и относится к ведущему осложнению обширных травм, объемных операций, различных боевых ранений. Для ее минимизации широко используется транексамовая кислота, вопросы безопасности применения которой, до настоящего времени не сняты. Наряду с этим, рассматривается перспективность использования малых доз фибрин-мономера для управления кровотоком, как с точки зрения эффективности, так и безопасности.

**Цель исследования** – оценка тромбобезопасности применения транексамовой кислоты в сравнении с фибрин-мономером при индуцированной антиагрегантами или стрептокиназой коагулопатии в эксперименте.

**Методика.** В экспериментах *in vivo* сопоставляли протромботический эффект от внутривенного введения транексамовой кислоты (15 мг/кг) и фибрин-мономера (0,25 мг/кг) на двух моделях фармакологически-обусловленной коагулопатии, смоделированной антиагрегантами (ацетилсалициловая кислота в дозе 2,0 мг/кг, в сочетании с клопидогрелом в дозе 8,0 мг/кг) или стрептокиназой (150 000 МЕ/кг). Оценивали ряд показателей системы гемостаза, данные ротационной тромбоэластометрии и калиброванной тромбографии.

**Результаты.** Применение транексамовой кислоты на фоне антиагрегантной терапии сопровождалось увеличением уровня маркера тромбиногенеза и фибринолиза – D-димера, при сохранении плотностных характеристик сгустка крови. При ее использовании совместно со стрептокиназой наблюдали увеличение интенсивности генерации тромбина и ускорение образования сгустка крови. В случае замены транексамовой кислоты на фибрин-мономер не было зафиксировано какого-либо видимого влияния последнего на параметры оценки системы гемостаза, а также интегральных методов исследования на обеих воспроизведенных моделях коагулопатии.

**Заключение.** Транексамовая кислота при системном применении, уменьшая раневую кровопотерю, вызывала формирование гиперкоагуляционного сдвига. Перспективный гемостатический препарат фибрин-мономер, получаемый из плазмы крови, при внутривенном введении также снижал кровопотерю, однако не приводил к появлению признаков тромботической опасности. Таким образом, получены новые данные о потенциальной возможности и безопасности использования фибрин-мономера для управления посттравматическим кровотоком.

**Ключевые слова:** модель коагулопатии; тромбобезопасность; транексамовая кислота; фибрин-мономер; стрептокиназа; антиагреганты; гемостатический эффект

**Для цитирования:** Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И. Сравнительный анализ тромбобезопасности при использовании транексамовой кислоты и фибрин-мономера на фоне антиагрегантной или фибринолитической терапии в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 14–23.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.14-23

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Момот А.П., Вдовин В.М.; сбор и обработка материала – Вдовин В.М., Момот А.П., Шахматов И.И.; статистическая обработка – Вдовин В.М.; написания текста, редактирование – Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех ее частей – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Вдовин Вячеслав Михайлович, e-mail: erytrab@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Алтайского государственного медицинского университета.

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

Поступила 01.10.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

Momot A.P.<sup>1,2</sup>, Vdovin V.M.<sup>1</sup>, Shakhmatov I.I.<sup>1</sup>

## Comparative analysis of thrombotic safety by using tranexamic acid and a fibrin monomer during the antiplatelet or fibrinolytic therapy in experiment

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

40 Lenina Ave, Barnaul, 656038, Russian Federation;

<sup>2</sup>Altai Branch of FSBI «National Research Center for Hematology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,

½ Lyapidevskogo Str, Barnaul, 656045, Russian Federation

**Introduction.** Severe blood loss often leads to death, and it is one of the leading complications of extensive trauma, major operations, and various combat wounds. Tranexamic acid is widely used for blood loss minimization; however, its safety issues have not been resolved yet. Also, the article considers the prospects of using fibrin monomer at low doses to control bleeding in terms of both efficacy and safety.

**Aim.** To compare the thrombotic safety of tranexamic acid and a fibrin monomer in antiaggregant- or streptokinase-induced coagulopathy in experiment.

**Methods.** The prothrombotic effect of intravenous administration of tranexamic acid (15 mg/kg) and fibrin monomer (0.25 mg/kg) was compared in two *in vivo* models of pharmacologically-induced coagulopathy caused by antiplatelet drugs (acetylsalicylic acid 2.0 mg/kg in combination with clopidogrel 8.0 mg/kg) and streptokinase (150,000 IU/kg). Parameters of the hemostasis system, data of rotational thromboelastometry, and calibrated thrombography were studied.

**Results.** The administration of tranexamic acid during the antiaggregant therapy was accompanied by an increase in D-dimer, a marker of thrombinogenesis and fibrinolysis, while maintaining the blood clot density characteristics. When tranexamic acid was used together with streptokinase, the intensity of thrombin generation increased, and the blood clot formation accelerated. When tranexamic acid was replaced by fibrin monomer, no visible effect of fibrin monomer on the hemostasis parameters or the data of the integrated study methods was observed in either model of coagulopathy.

**Conclusion.** Tranexamic acid when administered systemically reduced wound blood loss and, thus, induced a hypercoagulation shift. The promising hemostatic drug, fibrin monomer, obtained from the blood plasma also reduced the blood loss when administered intravenously but did not cause signs of thrombotic danger. Thus, new data were obtained on the potential and safety of using fibrin monomer for the treatment of post-traumatic hemorrhage.

**Keywords:** coagulopathy model; thrombotic safety; tranexamic acid; fibrin monomer; streptokinase; antiplatelets; hemostatic effect

**For citation:** Momot A.P., Vdovin V.M., Shakhmatov I.I. Comparative analysis of thrombotic safety by using tranexamic acid and a fibrin monomer during the antiplatelet or fibrinolytic therapy in experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 14–23. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.14-23

**Author's contribution:** concept and design of the study – Momot A.P., Vdovin V.M.; collection and processing of material – Vdovin V.M., Momot A.P., Shakhmatov I.I.; statistical processing – Vdovin V.M.; writing and editing the text – Momot A.P., Vdovin V.M., Shakhmatov I.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** *Vjacheslav M. Vdovin*, PhD, associate prof., head of the department of pathological physiology Altai State Medical University (ASMU), 40 Lenina Ave, Barnaul, 656038, Russian Federation, e-mail: erytrab@gmail.com

### Information about the authors:

Momot A.P., <https://orcid.org/0000-0002-8413-5484>Vdovin V.M., <https://orcid.org/0000-0002-4606-3627>Shakhmatov I.I., <https://orcid.org/0000-0002-0979-8560>

**Acknowledgments.** The work was supported by the ASMU.

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

Received 01.10.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Посттравматическая коагулопатия в настоящее время рассматривается в качестве основного звена патогенеза осложнений, развивающихся в следствии обширных травм, объемных хирургических вмешательств, всевозможных боевых повреждений и про-

чих неотложных состояний [1-3]. Кровотечение, которое возникает в результате повреждения тканей, может носить угрожающий для жизни характер и, зачастую, требует оказания неотложной специализированной помощи для предотвращения летального исхода [4].

Для минимизации манифестирующей кровопотери в клинической практике существуют подходы, включающие в себя использование как местных средств остановки кровотечения, так и ряда системных гемостатических средств, отличающихся друг от друга по механизму своего действия [2, 5]. Наряду с посттравматической коагулопатией нужно обратить отдельное внимание на геморрагический синдром, нередко возникающий на фоне применения препаратов антитромботической направленности [2, 6, 7].

В область наших научных интересов включены различные способы системного управления кровопотерей. Как уже было сказано выше, разнообразие гемостатиков системного действия, позволяют врачу находить индивидуальные подходы для купирования кровотечения. Наряду с учетом эффективности таких терапевтических приемов, в настоящее время все большее внимание специалистами уделяется вопросам безопасности их применения. Это связано с тем, что накоплены убедительные свидетельства событий, в виде тромботических осложнений, после применения ряда системных гемостатиков [2, 8, 9].

Более 15 лет назад нами была выдвинута гипотеза о наличии у препарата фибрин-мономера (ФМ), получаемого из плазмы крови, способности к минимизации посттравматической кровопотери. Экспериментальные исследования с экзогенно вводимым в кровоток ФМ подтвердили наши предположения как на моделях с интактными животными [10], так и на фоне коагулопатии, вызванной применением различных препаратов антитромботического действия [11], в условиях дозированной травмы печени. В недавних публикациях мы продемонстрировали гемостатические свойства ФМ, реализующиеся на фоне угнетения агрегационной функции тромбоцитов [12], а также при активации фибринолиза стрептокиназой [13]. При этом, эффективность ФМ была сопоставима с хорошо известным системным гемостатическим препаратом – транексамовой кислотой (ТК). Однако, в этих работах нами не был проведен анализ тромбобезопасности в принятых подходах.

**Цель исследования** – оценка тромбобезопасности применения транексамовой кислоты в сравнении с фибрин-мономером при индуцированной антиагрегантами или стрептокиназой коагулопатии в эксперименте.

### Методика

В исследовании были использованы 100 здоровых кроликов (самцы) породы «Шиншилла», массой 3,0–4,5 кг. При помощи генератора случайных чисел из животных были сформированы 6 экспериментальных

выборок. На первых трех группах моделировалось угнетение агрегационной функций тромбоцитов, на остальных – активация фибринолиза стрептокиназой. До применения препаратов у всех животных получали кровь из краевой вены уха для оценки системы гемостаза.

Животным групп № 1 ( $n=13$ ), № 2 ( $n=22$ ) и № 3 ( $n=13$ ) для моделирования коагулопатии, обусловленной угнетением агрегационной функции тромбоцитов, «per os» вводилась смесь растворенных в воде ацетилсалициловой кислоты в дозе 2,0 мг/кг (Тромбо АСС®, фирма «Ланнахер Хайльмиттель ГмбХ», Австрия) и клопидогрела в дозе 8,0 мг/кг (Плавикс®, фирма «Санофи Винтроп Индустрия», Франция). Через один час производили введение препаратов в краевую вену уха (внутривенно, в/в): группе № 1 – раствор плацебо объемом 0,5 мл, содержащий 3,75 М раствор мочевины (соответствующий ее концентрации в растворе ФМ), группе № 2 – ТК в дозе 15 мг/кг (Транексам®, фирма ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) и группе № 3 – ФМ в дозе 0,25 мг/кг (ООО фирма «Технология-Стандарт», Россия, патент № 2522237, РФ; 2014). По истечении 1 часа от предшествующего введения у животных групп № 1 и № 3 и через 30 мин у группы № 2 производили повторный забор венозной крови. Как было установлено нами ранее, ФМ эффективен при его введении за 1 час до моделирования кровотечения [14]. Однако ТК, по данным производителя, вводят в системный кровоток за 20–30 мин до хирургического вмешательства для профилактики кровотечения (Инструкция по применению, ЛСР-001709/07). Эти обстоятельства и определили особенности описанного выше дизайна эксперимента.

В свою очередь, животным групп № 4 ( $n=16$ ), № 5 ( $n=12$ ) и № 6 ( $n=24$ ) для активации фибринолитических реакций осуществляли в/в болюсное введение водного раствора стрептокиназы в дозе 150 000 МЕ/кг (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь). По истечении 1 часа применяли следующие препараты: группе № 4 – раствор плацебо (0,5 мл), группе № 5 – ТК (15 мг/кг) и группе № 6 – ФМ (0,25 мг/кг). После этого через 30 мин у группы № 5 и 1 час – у групп № 4 и № 6 производили повторный забор венозной крови.

Все эксперименты выполнены слепым методом, при котором экспериментаторы не информировались к какой группе относятся животные и применяемых у них препаратов.

Одну часть отобранных образцов крови стабилизировали калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты для определения количества тромбоци-

тов, вторую — 0,11 М (3,8 %) раствором цитрата натрия (кровь и цитрат в соотношении 9:1) для изучения параметров системы гемостаза. Дальнейшее получение богатой или обедненной тромбоцитами плазмы выполняли по общепринятой методике.

В венозной крови определяли количество тромбоцитов на гематологическом анализаторе «Drew-3» («Drew Scientific Inc.», Великобритания-США), а также выполняли ротационную тромбоэластометрию (ТЭМ) на тромбоэластометре «ROTEM® Gamma» с набором реагентов «star-TEM®» («Pentapharm GmbH», Германия) в режиме «Natem». Оценивали показатели СТ (время коагуляции), угол  $\alpha$  (альфа), CFT (время формирования сгустка), MCF (максимальная твердость сгустка) и A10 (плотность сгустка на 10 минуте). Агрегационную способность кровяных пластинок оценивали в обогащенной тромбоцитами плазме крови на агрегометре Chronolog 490-2D («CHRONO-LOG Corporation», США), с агонистом агрегации — аденозиндифосфатом (АДФ) в исходной концентрации 10 мкМ (фирма «Технология-Стандарт», Россия). В обедненной тромбоцитами плазме крови при помощи коагулометра «Thrombostat 2» («Behnk Elektronik», Германия) и наборов реагентов фирмы «Технология-Стандарт» проводили исследование активированного парциального тромбопластинного времени свертывания (АПТВ), концентрации фибриногена, а также активности антитромбина (АТ) на спектрофотометре «Photometer 5010 v5+» («Robert Riele GmbH Co & KG», Германия). АПТВ представляли в виде отношения, путем деления значения времени свертывания в опытном образце плазмы на значение времени свертывания в контрольном образце. Используя анализатор-рефлектометр «NuscoCard Rader II» и тест-систему «NuscoCard® D-Dimer» («Axis-Shield PoC AS», Норвегия), определяли уровень D-димера. Для оценки интенсивности тромбиногенеза в образцах плазмы применяли калиброванную автоматизированную тромбографию по *H.C. Hemker* (2003) на планшетном флуориметре «Fluoroskan Ascent» с программным обеспечением «Thrombinoscope™ 3.0.0.26» («ThermoFisher SCIENTIFIC», Финляндия) и наборами реагентов FluCa-Kit, PPP-Reagent и Thrombin Calibrator («Thrombinoscope® bv», Нидерланды). Получали следующие показатели: Lagtime (время фазы инициации образования тромбина); ETP (эндогенный тромбиновый потенциал); Peack thrombin (концентрация тромбина); ttPeak (время достижения пика (максимальной концентрации) тромбина) и V thrombin (скорость образования тромбина).

Проверка гипотезы о нормальности распределения признаков выполнена при помощи критерия Шапиро–Уилка. В зависимости от распределения признаков применяли t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни или W-критерий Вилкоксона. Статистическая значимость различий считалась при  $p < 0,05$ . Экспериментальные данные обрабатывались при помощи статистической программы MedCalc Version 17.9.7 (лицензия BU556-P12YT-BBS55-YAH5M-UBE51). Все полученные результаты отражены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q): Me [Q25÷Q75].

## Результаты

По результатам проведенного исследования у групп животных с № 1 по № 3 была продемонстрирована модель фармакологически обусловленной тромбоцитопатии (**табл. 1**). Последствием применения двойной антиагрегантной терапии, в указанных выборках, стало снижение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (в 4,5, 3,0 и 16,6 раза, соответственно), без изменения числа этих клеток. При этом, в группе плацебо (группа № 1) в двух случаях полностью прекращалась регистрация параметров ротационной тромбоэластометрии.

В случае применения гемостатиков системного действия — ТК в группе № 2 или ФМ — в группе № 3, на фоне действия антиагрегантов, четко прослеживались отличия в определяемых параметрах оценки системы гемостаза. В частности, в/в введение животным ТК сопровождалось кратным увеличением уровня известного маркера тромбиногенеза и фибринолиза — D-димера (в 3,3 раза). При проведении ротационной тромбоэластометрии в этой группе не было зафиксировано случаев нарушения регистрации параметров данного метода, обусловленных влиянием антиагрегантов. Плотностные характеристики сгустка и время его формирования не отличались от исходных значений.

При замене ТК на ФМ (группа № 3) не наблюдалось протромбогенных признаков, в виде повышения уровня D-димера. Вместе с тем, при проведении тромбоэластометрии отмечалась гипокоагуляция, о чем свидетельствовало снижение плотностных характеристик сгустка (по данным угла  $\alpha$ , MCF и A10) и увеличение времени его формирования (по данным CFT).

В следующих трёх группах животных (№ 4, № 5 и № 6) оценивалось состояние системы гемостаза после применения гемостатиков и плацебо на фоне активации фибринолитических реакций (**табл. 2**). Введение в системный кровоток стрептокиназы статистически значимо снижало содержание фибриногена (в 1,3–1,4 раза) во всех исследуемых выборках, что так-

же подтверждало воспроизведение экспериментальной модели. В группе плацебо (группа № 4), наряду с гипофибриногенемией, отмечалась гипокоагуляция при проведении тромбоэластометрии – в виде уменьшения плотностных характеристик сгустка (по параметрам угол  $\alpha$ , MCF и A10) и увеличения времени его формирования (по параметрам CT и CFT).

Применение системных гемостатиков ТК и ФМ на фоне действия стрептокиназы имело отличие по достигаемым результатам. Так, введение ТК животным (группа № 5) сопровождалось увеличением пиковой концентрации тромбина (по показателю Peak thrombin в 1,3 раза) и скорости его формирования (по показателю V thrombin в 1,6 раза) – по данным автоматизированной тромбографии. Эти изменения сочетались с укорочением времени начала коагуляции (по параметру CT в 1,6 раза) при сохранении плотностных характеристик сгустка крови (по данным угла  $\alpha$ , MCF и A10) при оценке тромбоэластограммы.

Системному введению ФМ (группа № 6) сопутствовало лишь умеренное снижение числа тромбоцитов в венозной крови.

Обсуждая приведенные выше данные можно обратить внимание на то, что транексамовая кислота входит в перечень широко используемых препаратов системного гемостатического действия для снижения кровопотери как на догоспитальном этапе, так и в условиях стационара [15]. В перечне показаний к ее применению относят кровотечения, связанные с тромбоцитопатией и/или тромбоцитопенией [16, 17], лекарственным тромболизисом [18], а также геморрагический синдром в острый период тяжелой травмы, в том числе, с активацией фибринолиза [2, 19].

Как известно, механизм терапевтического действия ТК во многом связан с ее конкурентной способностью угнетать лизин-связывающие домены в молекуле плазминогена, что препятствует его трансформации в плазмин на поверхности фибрина и ряда других белков [15]. Следствием этого, является смещение гемостатического равновесия в сторону гиперкоагуляции и тромбообразования. Таким образом, в случае использования ТК существует потенциальный риск возникновения тромботических осложнений [20]. Действительно, в ряде работ описаны случаи таких осложнений в ходе рандомизированных многоцентровых исследований, в том числе, посвященных посттравматической кровопотере [21, 22].

В настоящем сравнительном исследовании при воспроизведении двух вариантов фармакологически-обусловленной коагулопатии, были получены данные, отражающие отличия в последствиях введе-

ния ТК или ФМ на изменения в системе гемостаза. При этом, в материалах наших предшествующих публикаций было показано наличие высокой гемостатической активности как у ТК, так и у ФМ в модельных экспериментах с угнетением агрегационной функции тромбоцитов [12], а также при активации фибринолиза стрептокиназой [13]. В частности, кратность снижения объема посттравматической кровопотери, в зависимости от выбранной модели, при применении ТК оказалось равной 4,8-15,4 раза, а при использовании ФМ – 5,9-11,0 раза.

По современным представлениям, отсутствие кровотечений или тромбозов в условиях физиологической нормы у человека связано с поддержанием так называемого «гемостатического равновесия» или «гемостатического баланса» с участием ряда многокомпонентных систем, во многом, противостоящих друг другу [23]. С одной стороны, активация свертывания крови, наряду с угнетением, в той или иной мере, антикоагулянтных и фибринолитических реакций – известный путь к тромбозу, в то время как гипокоагуляция и гиперфибринолиз – ведущий причинный фактор кровотечений [24, 25]. Последнее продемонстрировано, в том числе, в нашем центре при изучении гемостатических реакций на протяжении физиологически протекающей беременности [26]. Иными словами, нарушение этого баланса в случае блокады фибринолитических реакций (так называемое «отключение фибринолиза») при травме, сепсисе, акушерских кровотечениях, в определенных условиях, сопровождается развитием коагулопатии тромботического фенотипа [20, 27].

Исходя из текущего анализа, представленного в данной статье, можно видеть, что результативность ТК, в наших экспериментах, может быть объяснена смещением гемостатического равновесия в сторону потенциального тромбообразования. Так, в модели с использованием антиагрегантов мы наблюдали многократное увеличение уровня D-димера, который относится к классическим маркерам активации свертывания крови [28]. С другой стороны, ингибирование транексамовой кислотой, предварительно стимулированного фибринолиза с помощью стрептокиназы, также сопровождалось проявлением предтромбоза в виде увеличения пиковой концентрации и скорости образования тромбина, а также ускорения образования сгустка фибрина по данным тромбоэластометрии.

В отличие от ТК, препарат ФМ способствовал уменьшению посттравматической кровопотери без повышения гемостатического потенциала. При этом, на модели с использованием антиагрегантов после применения ФМ, как и в группе с плацебо, был отмечен

Таблица 1/ Table 1

Результаты оценки системы гемостаза у животных в группах на фоне действия антиагрегантов

Evaluation results of animal's hemostasis system in groups on the background of antiaggregants action

Показатели Indicators	Группа № 1/Group # 1		Группа № 2/Group # 2		Группа № 3/Group # 3	
	до ААГ и плацебо/be- fore AGG and placebo (1a)	после ААГ и плацебо/ after AGG and placebo (1b)	до ААГ и ТК/ before AGG and TXA (2a)	после ААГ и ТК/ after AGG and TXA (2b)	до ААГ и ФМ/ before AGG and FM (3a)	после ААГ и ФМ/ after AGG and FM (3b)
Число тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /l	438,0 [419,0÷484,0]	466,0 [412,0÷515,0] <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,153	433,5 [373,0÷532,0]*	427,5 [356,3÷491,0]* <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,189	476,0 [419,0÷518,0]	426,0 [405,0÷557,0] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,570
АДФ-индуцирован- ная агрегация, % ADP-induced aggregation, %	20,1 [18,4÷45,9]*	4,5 [0,6÷7,0] * <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,001 Δ -77,6 %	24,0 [19,0÷46,5]*	8,0 [4,9÷10,1]* <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,000001 Δ -66,7 %	19,9 [13,3÷20,1]	1,2 [1,0÷2,0]* <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,001 Δ -94,0 %
АПТВ, отношение	1,1 [0,9÷1,1]*	1,1 [0,9÷1,1]* <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,110	0,9 [0,8÷1,1]	0,9 [0,8÷1,0] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,287	1,0 [0,9÷1,0]	0,9 [0,9÷1,0] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,839
D-димер, нг/мл D-dimer, ng/ml	100,0 [100,0÷175,0]*	100,0 [100,0÷200,0]* <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,180	300,0 [200,0÷400,0]	1000,0 [525,0÷1350,0] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,010 Δ +233,3 %	150,0 [100,0÷275,0]*	175,0 [100,0÷300,0]* <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,463
Антитромбин, % Antithrombin, %	100,0 [99,4÷102,0]*	102,0 [101,0÷105,0] <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,374	101,0 [96,8÷102,0]	102,0 [100,0÷103,0]* <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,307	102,9 [99,6÷105,0]	101,1 [96,8÷104,8] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,067
Результаты ротационной тромбоэластометрии / Results of rotational thromboelastometry						
СТ, с CT, s	508,0 [391,0÷892,5]	642,0 [140,0÷1190,0] (н.с. в 2 случаях) <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,616	673,0 [484,5÷784,0]	587,0 [386,0÷854,0] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,384	431,5 [246,0÷962,8]*	828,0 [452,5÷1154,0] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,221
Угол α, град. angle α, gr.	70,0 [50,0÷78,0]*	62,0 [44,0÷73,0] (н.с. в 2 случаях) <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,813	54,0 [45,0÷64,5]	58,0 [43,0÷61,0] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,902	72,0 [45,8÷76,8]*	46,0 [39,5÷64,0] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,017 Δ -36,1 %
CFT, с CFT, s	152,5 [112,5÷326,3]*	233,0 [116,0÷315,0]* (н.с. в 2 случаях) <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,999	217,0 [152,0÷298,0]	238,0 [183,3÷336,8] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,267	166,5 [111,0÷273,5]	276,0 [147,8÷346,5] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,029 Δ +65,8 %
MCF, мм MCF, mm	54,0 [51,5÷65,0]	50,0 [46,0÷61,0] (н.с. в 2 случаях) <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,156	61,0 [55,0÷70,0]	64,0 [58,0÷71,0] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,342	63,0 [58,0÷66,3]	54,5 [50,5÷62,3] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,079
A10, мм A10, mm	42,0 [34,0÷64,5]	39,0 [35,0÷52,0] (н.с. в 2 случаях) <i>p</i> <sub>1a-1b</sub> =0,240	46,0 [37,0÷56,5]	48,0 [35,0÷56,5] <i>p</i> <sub>2a-2b</sub> =0,925	56,0 [41,5÷60,0]	40,5 [34,8÷49,0] <i>p</i> <sub>3a-3b</sub> =0,041 Δ -27,7 %

**Примечание.** ААГ – антиагреганты; н.с. – нет свертывания. Здесь и в табл. 2: ТК – транексамовая кислота; ФМ – фибрин-мономер; при-  
знаки, не подчиняющиеся нормальному распределению, обозначены – \*; *p* – уровень статистической значимости различий сравнивае-  
мых показателей; Δ – статистически значимая разница изучаемого показателя.

**Note.** AAG – antiaggregants; n.s. – no clotting. Here and in Table 2: TXA – tranexamic acid; FM – fibrin monomer; signs not obeying the normal distribu-  
tion are marked with – \*; *p* – statistical significance level of the compared indicators differences; Δ – statistically significant difference of the studied indicator.

Таблица 2/ Table 2

Результаты оценки системы гемостаза у животных в группах на фоне действия стрептокиназы

Evaluation results of animal's hemostasis system in groups on the background of streptokinase action

Показатели Indicators	Группа № 4/Group # 4		Группа № 5/Group # 5		Группа № 6/Group # 6	
	до СК и плацебо /before SK and placebo (4a)	после СК и плацебо/after SK and placebo (4b)	до СК и ТК / before SK and TA (5a)	после СК и ТК / after SK and TA (5b)	до СК и ФМ / before SK and FM (6a)	после СК и ФМ /after SK and FM (6b)
Число тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /l	365,0 [317,0÷454,0]*	335,0 [305,0÷419,5]* <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,075	380,0 [297,5÷417,8]	333,0 [294,0÷381,5]* <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,784	458,5 [377,0÷510,3]	388,0 [317,0÷445,0] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,018 Δ -15,4 %
АПТВ, отношение APPT, ratio	1,1 [0,9÷1,1]	1,0 [1,0÷1,0]* <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,730	1,0 [0,8÷1,2]	1,1 [1,1÷1,2] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,177	1,1 [1,0÷1,2]	1,1 [0,9÷1,2] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,889
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	3,0 [2,4÷3,2]	2,1 [1,9÷2,8] <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,0003 Δ -30,0 %	2,7 [2,3÷2,9]	1,9 [1,6÷2,1] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,002 Δ -29,6 %	3,0 [2,1÷3,6]	2,3 [1,8÷3,0] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,003 Δ -23,3 %
D-димер, нг/мл D-dimer, ng/ml	100,0 [100,0÷175,0]*	100,0 [100,0÷200,0]* <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,500	100,0 [100,0÷100,0]*	100,0 [100,0÷125,0]* <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,201	100,0 [100,0÷200,0]*	100,0 [100,0÷200,0]* <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,675
Антитромбин, % Antithrombin, %	102,0 [100,5÷107,3]	101,5 [96,8÷104,5] <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,184	109,6 [107,0÷112,3]	106,3 [98,8÷108,8] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,010 Δ -3,0 %	100,0 [99,0÷107,8]*	100,5 [96,0÷107,3] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,184
Результаты калиброванной автоматизированной тромбографии Results of calibrated automated thrombography						
Lagtime, мин Lagtime, min	2,1 [2,1÷2,3]	2,3 [2,2÷2,3] <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,108	2,0 [1,8÷2,1]	2,0 [1,8÷2,0]* <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,345	2,0 [1,9÷2,0]	1,8 [1,7÷2,0] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,584
ETP, нмоль×мин ETP, nmol×min	454,2 [431,5–461,6]	409,8 [390,2–426,9]* <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,237	457,5 [420,3÷511,3]	504,2 [450,9÷550,7] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,114	415,4 [280,7÷466,1]	413,5 [285,9÷472,6] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,463
Peak thrombin, нмоль/л Peak thrombin, nmol/l	75,3 [65,9÷78,8]	65,4 [63,7÷74,1] <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,398	85,7 [64,1÷103,6]	109,6 [86,6÷120,3] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,021 Δ +21,8 %	67,8 [66,1÷81,2]	81,7 [63,1÷94,5] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,917
ttPeak, мин ttPeak, min	5,7 [5,3÷5,8]	6,0 [5,4÷6,0]* <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,866	5,0 [4,7÷5,3]	4,8 [4,3÷5,3] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,234	5,0 [4,4÷5,3]	4,8 [4,3÷5,2] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,893
V thrombin, нмоль/мин V thrombin, nmol/min	22,6 [20,4÷23,6]	22,0 [19,3÷23,7] <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,735	24,5 [17,6÷39,6]*	40,0 [27,2÷49,1] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,033 Δ +63,3 %	22,4 [19,2÷32,1]	26,6 [20,9÷36,2] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,917
Результаты ротационной тромбоэластометрии Results of rotational thromboelastometry						
CT, с CT, s	457,5 [351,5÷571,0]	617,5 [368,3÷819,0]* <i>p</i> <sub>4a-4b</sub> =0,023 Δ +34,9 %	862,5 [754,3÷895,3]	531,0 [386,0÷800,0] <i>p</i> <sub>5a-5b</sub> =0,020 Δ -38,4 %	547,0 [296,0÷815,5]*	507,5 [410,3÷696,8] <i>p</i> <sub>6a-6b</sub> =0,670

Продолжение табл. 2 см. на стр. 21.

Показатели Indicators	Группа № 4/Group # 4		Группа № 5/Group # 5		Группа № 6/Group # 6	
	до СК и плацебо /before SK and placebo <sup>(4a)</sup>	после СК и плацебо/after SK and placebo <sup>(4b)</sup>	до СК и ТК / before SK and TA <sup>(5a)</sup>	после СК и ТК / after SK and TA <sup>(5b)</sup>	до СК и ФМ / before SK and FM <sup>(6a)</sup>	после СК и ФМ /after SK and FM <sup>(6b)</sup>
Угол α, град. angle α, gr.	55,0 [43,8÷60,3]	41,0 [28,0÷56,5] $p_{4a-4b}=0,016$ $\Delta -25,5\%$	45,5 [42,5÷48,5]*	46,5 [42,8÷49,5] $p_{5a-5b}=0,689$	54,5 [42,0÷66,5]	58,0 [45,0÷62,5] $p_{6a-6b}=0,273$
CFT, с CFT, s	268,5 [169,8÷293,8]*	384,0 [219,8÷480,0] $p_{4a-4b}=0,098$	284,0 [247,5÷314,0]	268,5 [236,5÷331,3] $p_{5a-5b}=0,969$	203,0 [143,5÷334,0]*	203,0 [145,8÷280,3]* $p_{6a-6b}=0,277$
MCF, мм MCF, mm	58,0 [51,5÷63,8]	35,0 [26,0÷50,3] $p_{1a-1b}=0,016$ $\Delta -39,7\%$	51,0 [49,5÷54,0]	52,0 [47,3÷55,3] $p_{5a-5b}=0,936$	52,0 [48,5÷63,5]	52,0 [44,0÷62,5]* $p_{6a-6b}=0,067$
A10, мм A10, mm	43,0 [33,3÷49,5]	26,5 [22,3÷37,5] $p_{4a-4b}=0,016$ $\Delta -38,4\%$	36,0 [33,8÷37,5]*	36,5 [31,0÷40,0] $p_{5a-5b}=0,845$	41,5 [32,3÷52,0]	41,0 [30,0÷52,0] $p_{6a-6b}=0,061$

**Примечание.** СК – стрептокиназа.

**Note.** SK – streptokinase.

гипокоагуляционный сдвиг (по данным тромбоэластометрии), при отсутствии увеличения уровня D-димера. В случае же использования ФМ на модели с активацией фибринолиза, наблюдалось умеренное снижение числа тромбоцитов при сохранении показателей тромбоэластометрии и нормальном уровне D-димера. По всей видимости, роль тромбоцитов имеет определенное значение при реализации эффектов ФМ, в отличие от ТК [29]. Эти экспериментальные данные, вероятно, смогут помочь в дальнейшем при расшифровке механизмов действия низких доз ФМ в клеточно-опосредованном и независимом от тромбина пути остановки кровотечения.

Стоит отдельно обратить внимание на то, что в предыдущих публикациях мы у интактных животных, с системным введением экзогенного ФМ в дозах ниже 0,5 мг/кг, не наблюдали никакого ответа на этот гемостатик, как на параметры коагулограммы, так и на данные интегральных методов исследования – ротационной тромбоэластометрии и калиброванной тромбографии [10, 30].

### Заключение

На двух экспериментальных моделях – угнетения агрегационной функции тромбоцитов и активации фибринолиза стрептокиназой, был проведен сравнительный анализ влияния ТК и ФМ на параметры системы гемостаза, а также способность управ-

ления посттравматической кровопотерей. Системное применение препарата ФМ в дозе 0,25 мг/кг, сопровождающееся минимизацией кровопотери, не приводило к появлению признаков тромбогенности, связанных со смещением гемостатического потенциала.

Со своей стороны, ТК, как и в случае с ФМ, также многократно уменьшала раневую кровопотерю, ограничивая фибринолиз, на фоне формирования гиперкоагуляционного сдвига, документируемого увеличением интенсивности тромбоиногенеза и нарастанием уровня D-димера.

Анализ тромбобезопасности, приведенный в настоящей статье, дополнил ряд полученных нами ранее сведений по перспективности использования низких доз нового препарата из плазмы крови – фибрин-мономера, для управления посттравматической кровопотерей, в том числе на фоне фармакологически-обусловленной коагулопатии.

### Литература

(п.п. 1-4; 7-9; 15; 17; 19; 21-23; 25; 27 см. References)

- Мельник А.А. Механизм действия гемостатических лекарственных препаратов. *Новости медицины и фармации*. 2017; 622(10). Available at: [https://www.mif-ua.com/archive/article\\_print/45090](https://www.mif-ua.com/archive/article_print/45090)
- Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений (ВТЭО). *Флебология*. 2015; 2(4): 2-52.

10. Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И., Толстокоров И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О. и др. Системные гемостатические и протромботические эффекты фибрин-мономера в эксперименте при дозированной травме печени. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39(1): 6-12. <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190101>
11. Момот А.П., Вдовин В.М., Момот Д.А., Орехов Д.А., Шахматов И.И. Новые возможности снижения кровопотери при системном введении низкой дозы фибринмономера. *Клиническая физиология кровообращения*. 2019; 16(4): 267-73. <https://doi.org/10.24022/1814-6910-2019-16-4-267-273>
12. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Толстокоров И.Г., Лычева Н.А., Шевченко В.О. и др. Системные гемостатические эффекты фибрин-мономера при ингибировании агрегационной функции тромбоцитов в эксперименте. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19(1): 36-42. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-36-42>
13. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Красюкова В.О., Шахматов И.И., Лычева Н.А. и др. Минимизация посттравматического кровотечения при тромболитической терапии путем системного введения фибрин-мономера в эксперименте. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2020; 24(1): 78-86. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2020-1-78-86>
14. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Толстокоров И.Г., Шевченко В.О., Красюкова В.О. и др. Время-зависимые системные гемостатические эффекты фибрина-мономера при дозированной травме печени в эксперименте. *Казанский медицинский журнал*. 2019; 100(2): 257-63. <https://doi.org/10.17816/KMJ2019-257>
16. Чучалина А.Г., Хохлова А.Л., ред. *Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система)*. Выпуск XVIII. М.: Видокс; 2017.
18. Кулеш А.А., Демин Д.А. Внутривенный тромболитизис при ишемическом инсульте: 10 правил для практического невролога. *Медицинский совет*. 2022; 16(21): 175-83. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-21-175-183>
20. Момот А.П. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. В кн.: Рукавицына О.А., Игнатъева С.В., ред. *Система гемостаза. Теоретические основы и клиническая практика. Национальное руководство*. М.: ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа»; 2024: 451-86.
24. Литвинов Р.И. Молекулярные механизмы и клиническое значение фибринолиза. *Казанский медицинский журнал*. 2013; 94(5): 711-8.
26. Момот А.П., Кудинова И.Ю., Елыкомов В.А., Семёнова Н.А., Момот Д.А., Белозёров Д.Е. Роль фибринолитической активности крови в предупреждении тромбозов при физиологической беременности. *Доктор.Ру. Гематология*. 2016; 122(5): 21-8. <https://doi.org/10.18411/d-2016-059>
28. *Современные методы распознавания состояния тромботической готовности*. Под ред. Момот А.П. Барнаул: Изд-во Алтайского государственного университета; 2011.
29. Вдовин В.М., Сузопов Е.В., Шахматов И.И., Бобров И.П., Орехов Д.А., Долгатов А.Ю. и др. Морфологические предпосылки локального гемостатического эффекта экзогенного фибрин-мономера при его системном введении после травмы при подавлении агрегационной функции тромбоцитов в эксперименте. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 155-64. <https://doi.org/10.29413/ABS.2023-8.4.17>
30. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Бобров И.П., Момот Д.А., Шахматов И.И. и др. Влияние экзогенного фибрин-мономера на гемостатический потенциал и образование фибрина в области дозированной травмы печени в эксперименте. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020; 106(9): 1132-43. <https://doi.org/10.31857/S0869813920070092>

## References

1. Moore E.E., Moore H.B., Kornblith L.Z., Neal M.D., Hoffman M., Mutch N.J., et al Trauma-induced coagulopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021; 7(1): 30. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00264-3>
2. Peng H.T. Hemostatic agents for prehospital hemorrhage control: a narrative review. *Mil Med Res*. 2020; 7(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00241-z>
3. Karkouki K., Wijeyesundera D.N., Yau T.M., Beattie W.S., Abdelnaem E., McCluskey S.A., et al. The independent association of massive blood loss with mortality in cardiac surgery. *Transfusion*. 2004; 44(10): 1453-62. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04144.x>
4. Rossaint R., Afshari A., Bouillon B., Cerny V., Cimpoesu D., Curryet N., et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: sixth edition. *Crit. Care*. 2023; 27(1): 80. <https://doi.org/10.1186/s13054-023-04327-7>
5. Mel'nik A.A. Mechanism of hemostatic drugs action. *Novosti meditsiny i farmatsii*. 2017; 622(10). Available at: [https://www.mif-ua.com/archive/article\\_print/45090](https://www.mif-ua.com/archive/article_print/45090) (in Russian)
6. Russian clinical guidelines for diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications (VTE). *Flebologiya*. 2015; 2(4): 2-52. (in Russian)
7. Ageno W., Donadini M. Breadth of complications of long-term oral anticoagulant care. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018; 30(1): 432-8. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.432>
8. Ehrlich H.J., Henzl M.J., Gomperts E.D. Safety of factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events. *Haemophilia*. 2002; 8(2): 83-90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2002.00532.x>
9. Rajpurkar M., Croteau S.E., Boggio L., Cooper D.L. Thrombotic events with recombinant activated factor VII (rFVIIa) in approved indications are rare and associated with older age, cardiovascular disease, and concomitant use of activated prothrombin complex concentrates (aPCC). *J Blood Med*. 2019; 10: 335-40. <https://doi.org/10.2147/JBM.S219573>
10. Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И., Толстокоров И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О., et al. Systemic hemostatic and prothrombotic effects of fibrin monomer in the experiment with dosed injury of the liver. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal*. 2019; 39(1): 6-12. <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190101> (in Russian)
11. Момот А.П., Вдовин В.М., Момот Д.А., Орехов Д.А., Шахматов И.И. New opportunities to reduce blood loss with systemic administration of low-dose fibrin monomer. *Klinicheskaya fiziologiya krovoobrashcheniya*. 2019; 16(4): 267-73. (in Russian). <https://doi.org/10.24022/1814-6910-2019-16-4-267-273>
12. Vdovin V.M., Momot A.P., Orekhov D.A., Tolstokorov I.G., Lycheva N.A., Shevchenko V.O., et al. Experimental study of systemic hemostatic effects of fibrin monomer in inhibition of platelet aggregation function. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2020; 19(1): 36-42. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-36-42> (in Russian)

13. Vdovin V.M., Momot A.P., Orekhov D.A., Krasnyukova V.O., Shakhmatov I. I., Lycheva N.A., et al. Posttraumatic bleeding reduction by systemic administration of fibrin monomer in thrombolytic therapy. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2020; 24(1): 78-86. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2020-1-78-86> (In Russian)
14. Vdovin V.M., Momot A.P., Orekhov D.A., Tolstokorov I.G., Shevchenko V.O., Krasnyukova V.O., et al. Time-dependent systemic hemostatic effects of fibrin monomer in controlled liver injury in the experiment. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 100(2): 257–63. <https://doi.org/10.17816/KMJ2019-257> (in Russian)
15. Tengborn L., Blombäck M., Berntorp E. Tranexamic acid--an old drug still going strong and making a revival. *Thromb. Res*. 2015; 135(2): 231-42. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.11.012>
16. Chuchalina A.G., Hohlova A.L., eds. *Federal Drug Utilization Guidelines (formulary system). Release XVIII. [Federal'noe rukovodstvo po ispol'zovaniyu lekarstvennykh sredstv (formulyarnaya sistema)]*. Moscow: Vidoks; 2017. (In Russian)
17. Jia S., Hongwen J., Facheng R., Gang W., Meiyang X., Yuliang X., et al. Protective effects of tranexamic acid on clopidogrel before coronary artery bypass grafting: a multicenter randomized trial. *JAMA Surg*. 2013; 148(6): 538-47. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.1560>
18. Kulesh A.A., Demin D.A. Intravenous thrombolysis in ischemic stroke: 10 rules for the practical neurologist. *Meditsinskiy Sovet*. 2022; 16(21): 175–83. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-21-175-183> (In Russian)
19. Levy J.H., Koster A., Quinones Q.J., Milling T.J., Key N.S. Antifibrinolytic therapy and perioperative considerations. *Anesthesiology*. 2018; 128(3): 657-70. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001997>
20. Momot A.P. Disseminated intravascular coagulation syndrome. In: Rukavitsyna O.A., Ignat'eva S.V., eds. *Hemostasis system. Theoretical foundations and clinical practice. National guidelines. [Sistema gemostaza. Teoreticheskie osnovy i klinicheskaya praktika. Natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: Publishing Group Ltd. "GEOTAR-Media"; 2024: 451-86. (in Russian)
21. Patel P.A., Wyrobek J.A., Butwick A.J., Pivalizza E.G., Hare G.M.T., Mazer C.D., et al. Update on applications and limitations of perioperative tranexamic acid. *Anesthesia & Analgesia*. 2022; 135(3): 460-73. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000006039>
22. Ker K., Edwards P., Perel P., Shakur H., Roberts I. Effect of tranexamic acid on surgical bleeding: systematic review and cumulative meta-analysis. *BMJ*. 2012; 344: e3054. <https://doi.org/10.1136/bmj.e3054>
23. Hulshof A.M. *Innovative applications of global assays of hemostasis*. Maastricht University; 2023. <https://doi.org/10.26481/dis.20231215ah>
24. Litvinov R.I. Molecular mechanisms and clinical significance of fibrinolysis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 94(5): 711-8. (in Russian)
25. Helms J., Iba T., Connors J.M., Gando S., Levi M., Meziani F., Levy J.H. How to manage coagulopathies in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2023; 49(3): 273-90. <https://doi.org/10.1007/s00134-023-06980-6>
26. Momot A.P., Kudinova I.Yu., Elykomov V.A., Semenova N.A., Momot D.A., Belozero D.E. Role of blood fibrinolytic activity in the prevention of thrombosis in physiologic pregnancy. *Doktor.Ru. Gerontologiya*. 2016; 122(5): 21-8. <https://doi.org/10.18411/d-2016-059> (in Russian)
27. Moore H.B., Moore E.E., Neal M.D., Sheppard F.R., Kornblith L.Z., Draxler D.F., et al. Fibrinolysis shutdown in trauma: historical review and clinical implications. *Anesthesia & Analgesia*. 2019; 129(3): 762-73. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004234>
28. *Modern methods of recognizing the state of thrombotic readiness. [Sovremennye metody raspoznavaniya sostoyaniya tromboticheskoy gotovnosti]*. Ed. Momot A.P. Barnaul: Publ. of Altai State University; 2011. (in Russian)
29. Vdovin V.M., Suzopov E.V., Shakhmatov I.I., Bobrov I.P., Orekhov D.A., Dolgatov A.Yu., et al. Morphological determinants for the local hemostatic effect of exogenous fibrin monomer in its systemic administration after injury with inhibition of platelet aggregation in the experiment. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 155-64. <https://doi.org/10.29413/ABS.2023-8.4.17> (in Russian)
30. Vdovin V.M., Momot A.P., Orekhov D.A., Bobrov I.P., Momot D.A., Shakhmatov I.I., et al. Influence of exogenous fibrin monomer on hemostatic potential and formation of fibrin in the area of dosed liver injury in experiment. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2020; 106(9): 1132-43. <https://doi.org/10.31857/S0869813920070092> (in Russian)

#### Сведения об авторах:

**Момот Андрей Павлович**, доктор мед. наук, проф., ст. науч. сотр. Алтайского филиала ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; проф. каф. сестринского дела ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, e-mail: xuzan@yandex.ru;  
**Вдовин Вячеслав Михайлович**, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, e-mail: erytrab@gmail.com;  
**Шахматов Игорь Ильич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, e-mail: iish59@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 615.917 +616.24-005.98

**Башарин В.А.<sup>1</sup>, Чепур С.В.<sup>2</sup>, Щёголев А.В.<sup>1</sup>, Харитонов М.А.<sup>1</sup>, Толкач П.Г.<sup>1</sup>, Ярошенко Д.М.<sup>1</sup>, Арсентьев Л.В.<sup>1</sup>, Грачёва Г.Ю.<sup>3</sup>, Илатовская Ю.Д.<sup>3</sup>****Экспериментальная оценка эффективности респираторной поддержки для коррекции токсического отёка лёгких**<sup>1</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России,

194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6;

<sup>2</sup>ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России,

195043, Санкт-Петербург, Россия, Лесопарковая ул., д. 4;

<sup>3</sup>ООО «Ветеринарная клиника онкологии, травматологии и интенсивной терапии доктора Сотникова»,

198216, Санкт-Петербург, Россия, просп. Народного Ополчения, д. 19/1

**Введение.** В качестве подходов к лечению токсического отёка лёгких, вызванного ингаляционной интоксикацией пульмонотоксикантами, рассматривают фармакологическую терапию и респираторную поддержку. При тяжёлых интоксикациях фармакологическая тактика – малоэффективна. Данные об эффективности респираторной поддержки для коррекции токсического отёка лёгких в доступной литературе ограничены.

**Цель исследования** заключалась в экспериментальной оценке эффективности искусственной вентиляции лёгких с поддержанием положительного давления в конце выдоха у кроликов для коррекции токсического отёка лёгких, вызванного тяжёлой интоксикацией продуктами термодеструкции фторопласта-4, обладающими пульмонотоксическим действием.

**Методика.** Кроликов подвергали ингаляционной интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4 в концентрации, соответствующей 2 HLC<sub>50</sub> (показатель токсичности продуктов термодеструкции). Затем проводили искусственную вентиляцию лёгких (ИВЛ) и искусственную вентиляцию лёгких с поддержкой положительного давления в конце выдоха (ПДКВ). Оценивали выживаемость, среднюю продолжительность жизни кроликов, показатели газового состава артериальной крови и сатурацию, выполняли компьютерные томограммы груди и рентгенограммы органов грудной клетки кроликов.

**Результаты.** Воздействие продуктов термодеструкции фторопласта-4 (2 HLC<sub>50</sub>) приводило к крайне тяжёлой интоксикации кроликов, при этом токсичность продуктов термодеструкции была обусловлена входящим в их состав перфторизобутиленом, обладающим пульмонотоксическим действием. Проведение ИВЛ не предотвращало формирование токсического отёка лёгких у кроликов. В свою очередь проведение ИВЛ с ПДКВ способствовало увеличению выживаемости кроликов и значимому ( $p=0,024$ ) увеличению средней продолжительности жизни, по сравнению с животными, не получавшими лечение. У кроликов, не получавших лечение и кроликов, которым выполняли только ИВЛ уже через 5 ч после воздействия определили признаки альвеолярной фазы токсического отёка лёгких, выраженную артериальную гипоксемию и гиперкапнию, в то время как у кроликов, получавших ИВЛ с ПДКВ, выявили признаки только интерстициальной фазы отёка без выраженных нарушений оксигенации. На 7 сут после воздействия у выживших кроликов, получавших в качестве лечения ИВЛ с ПДКВ, нарушений структуры и функции дыхательной системы выявлено не было.

**Заключение.** Применение ИВЛ с ПДКВ эффективно для коррекции токсического отёка лёгких у кроликов, вызванного крайне тяжёлой интоксикацией продуктами термодеструкции фторопласта-4, содержащими перфторизобутилен, причём защитное действие обусловлено созданием положительного давления в конце выдоха.

**Ключевые слова:** фторопласт-4; перфторизобутилен; интоксикация; токсический отёк лёгких; респираторная поддержка; положительное давление в конце выдоха; газовый состав артериальной крови; лучевые методы исследования

**Для цитирования:** Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В., Харитонов М.А., Толкач П.Г., Ярошенко Д.М., Арсентьев Л.В., Грачёва Г.Ю., Илатовская Ю.Д. Экспериментальная оценка эффективности респираторной поддержки для коррекции токсического отёка лёгких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 24–33.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.24-33

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В., Харитонов М.А., Толкач П.Г.; сбор и обработка материала – Толкач П.Г., Ярошенко Д.М., Арсентьев Л.В., Грачёва Г.Ю., Илатовская Ю.Д.; статистическая обработка материала – Толкач П.Г., Ярошенко Д.М.; написание текста – Толкач П.Г., Ярошенко Д.М.; окончательное утверждение для публикации – Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В.; подготовка иллюстративного материала – Ярошенко Д.М., Илатовская Ю.Д.; редактирование – Толкач П.Г., Ярошенко Д.М. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Толкач Павел Геннадьевич, e-mail: pgtolkach@gmail.com

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

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов

Поступила 15.01.2024  
Опубликована 14.11.2024  
Поступила 20.12.2024

**Basharin V.A.<sup>1</sup>, Chepur S.V.<sup>2</sup>, Shchegolev A.V.<sup>1</sup>, Kharitonov M.A.<sup>1</sup>, Tolkach P.G.<sup>1</sup>,  
Yaroshenko D.M.<sup>1</sup>, Arsentev L.V.<sup>1</sup>, Gracheva G.U.<sup>3</sup>, Ilatovskaya Yu.D.<sup>3</sup>**

## **Experimental evaluation of the effectiveness of respiratory support for the correction of toxic pulmonary edema**

<sup>1</sup>Military Medical Academy named after S.M. Kirov,

6, st. Akademika Lebedeva, Saint-Petersburg, 194044, Russian Federation;

<sup>2</sup>State scientific-research test institute of the military medicine Defense Ministry Russian Federation,

4, st. Lesoparkovaya, Saint-Petersburg, 195043, Russian Federation;

<sup>3</sup>Veterinary clinic of oncology, traumatology and intensive care of Dr. Sotnikov,

19/1, Avenue Narodnogo opolcheniya, Saint-Petersburg, 198216, Russian Federation

**Background.** Pharmacological support and respiratory therapy are considered as approaches to the treatment of toxic pulmonary edema induced by inhalation intoxication of pulmonary toxicants. In severe intoxication, pharmacological tactics are ineffective. Information about the effectiveness of respiratory support for the correction of toxic pulmonary edema is limited in the available literature. **Aim.** Experimental evaluation of the effectiveness of the mechanical ventilation with maintained positive end-expiratory pressure (PEEP) for the correction of toxic pulmonary edema in rabbits caused by severe intoxication with thermal degradation products of fluoroplast-4.

**Methods.** Rabbits were exposed to inhalation intoxication with thermal degradation products of fluoroplast-4 (2HLC50). The rabbits underwent mechanical ventilation or mechanical ventilation with maintained PEEP. The survival rate, mean life expectancy, arterial blood gas composition and saturation were evaluated, and chest computed tomography and X-rays of the chest organs were performed.

**Results.** The exposure to thermal degradation products of fluoroplast-4 at a concentration of 2HLC50 (toxicity index of pyrolysis products) resulted in extremely severe intoxication of rabbits. In this process, the toxicity of thermal degradation products was due to their pulmonotoxic component, perfluoroisobutylene. Mechanical ventilation did not prevent the development of toxic pulmonary edema. At the same time, mechanical ventilation with PEEP provided an increase in the survival rate and a significant ( $p=0.024$ ) increase in mean life expectancy compared with animals that did not receive treatment. In rabbits that did not receive treatment and rabbits that received only mechanical ventilation, signs of the alveolar phase of toxic pulmonary edema and pronounced arterial hypoxemia and hypercapnia were detected already in five hours after the exposure. In contrast, rabbits treated with mechanical ventilation with PEEP showed only signs of the interstitial phase of edema without a pronounced impairment of oxygenation. On the 7th day after the exposure, there were no disorders of the respiratory system structure and function in the survived rabbits treated with mechanical ventilation with PEEP.

**Conclusion.** The use of mechanical ventilation with PEEP is effective for the correction of toxic pulmonary edema in rabbits induced by extremely severe intoxication with thermal degradation products of fluoroplast-4 containing perfluoroisobutylene, and the protective effect is due specifically to the creation of positive end-expiratory pressure.

**Keywords:** fluoroplast-4; perfluoroisobutylene; intoxication; toxic pulmonary edema; respiratory support; positive end-expiratory pressure; blood gas pressure; radiation study methods

**For citation:** Basharin V.A., Chepur S.V., Shchegolev A.V., Kharitonov M.A., Tolkach P.G., Yaroshenko D.M., Arsentev L.V., Gracheva G.U., Ilatovskaya Yu.D. Experimental evaluation of the effectiveness of respiratory support for the correction of toxic pulmonary edema. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 24–33. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.24-33

**Author's contribution:** concentration and study design – Basharin V.A., Chepur S.V., Shchegolev A.V., Kharitonov M.A., Tolkach P.G.; collection and processing of material – Tolkach P.G., Yaroshenko D.M., Arsentev L.V., Gracheva G.U., Ilatovskaya Yu.D.; statistical processing of material – Tolkach P.G., Yaroshenko D.M.; writing the text – Tolkach P.G., Yaroshenko D.M.; preparation of illustrative material – Yaroshenko D.M., Ilatovskaya Yu.D.; editing the text – Tolkach P.G., Yaroshenko D.M.; approval of the final version of the article – Basharin V.A., Chepur S.V., Shchegolev A.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

### **Information about the authors:**

Basharin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-8548-6836>

Chepur S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>

Shchegolev A.V., <https://orcid.org/0000-0001-6431-439X>

Kharitonov M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6521-7986>

Tolkach P.G., <https://orcid.org/0000-0001-5013-2923>

Yaroshenko D.M., <https://orcid.org/0000-0003-2305-6093>

Arsentev L.V., <https://orcid.org/0000-0002-5886-9900>

Gracheva G.U., <https://orcid.org/0009-0007-0589-1753>

Ilatovskaya Y.D., <https://orcid.org/0009-0005-8527-0003>

**For correspondence:** Pavel G. Tolkach, Dr. Med. Sci., deputy head of the department of military toxicology and medical protection Kirov Military Medical Academy, e-mail: [pgtolkach@gmail.com](mailto:pgtolkach@gmail.com)

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

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

Received 15.01.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Токсический отёк лёгких – тяжёлая форма патологии, формирующаяся при воздействии веществ, обладающих пульмонотоксическим действием. Данные вещества могут составлять основу химического оружия (фосген, дифосген и др.), загрязнять окружающую среду при возникновении аварийных ситуаций на химически опасных объектах (хлор, перфторизобутилен и др.), образовываться при термодеструкции полимерных материалов (диоксид азота, хлороводород, фтороводород и др.) [1-3]. На сегодняшний день, этиотропная терапия токсического отёка лёгких отсутствует, подходы к патогенетической терапии предусматривают применение фармакологических препаратов и проведение респираторной поддержки [2, 4-6].

Фармакологическая поддержка предполагает применение глюкокортикоидов, противовоспалительных препаратов, препаратов сурфактанта, стимуляторов антиоксидантной защиты клетки и др. [6, 7]. Следует отметить низкую эффективность фармакологических подходов для коррекции токсического отёка лёгких при тяжёлых интоксикациях веществами, обладающими пульмонотоксическим действием [2, 4, 8, 9].

В 2019 г. коллективом автором (Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В. и др.) был проведён анализ данных литературы по представленной проблеме и выдвинута гипотеза о том, что применение превентивной персонализированной стратегии, включающей проведение искусственной вентиляции лёгких с поддержанием положительного давления в конце выдоха, может быть эффективным подходом для коррекции токсического отёка лёгких [2].

**Цель исследования** состояла в экспериментальной оценке эффективности искусственной вентиляции лёгких с поддержанием положительного давления в конце выдоха у кроликов для коррекции токсического отёка лёгких, вызванного тяжёлой интоксикацией продуктами термодеструкции фторопласта-4, обладающими пульмонотоксическим действием.

## Методика

Экспериментальное исследование выполнено в два этапа. На первом этапе оценивали эффективность проведения ИВЛ, на втором – ИВЛ с ПДКВ для коррекции токсического отёка лёгких. В работе использовали кроликов-самцов породы Советская шиншилла, при проведении исследования соблюдали требования нормативно-правовых актов по работе с лабораторными животными. Для выведения животных из эксперимента им осуществляли внутривенное введение 10 % раствора лидокаина. Животных разделили на группы (в каждой группе  $n=4$ ): Контроль; Интоксикация 1; «ИВЛ»; Интоксикация 2; «ПДКВ».

Статическую ингаляционную интоксикацию продуктами термодеструкции фторопласта-4 в концентрации соответствующей двум средним летальным ( $2 \text{ HLC}_{50}$ , масса навески фторопласта-4 – 5,2 грамма) [9] проводили с контролем газовой смеси в ингаляционной камере во время воздействия. Концентрацию монооксида углерода и кислорода определяли при помощи портативного газоанализатора Автотест-02.02 (Мета, Россия). Определение концентрации перфторизобутилена проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, с использованием газового хроматографа «Agilent GC 7890B», оснащенного автосамплером «GC Sampler 80» и масс-детектором «Agilent GC/MSD 5975C». Ввиду отсутствия стандартного образца содержание перфторизобутилена определяли методом полуколичественного анализа по калибровочной зависимости пентафторпропионовой кислоты.

Животные групп Интоксикация 1 и Интоксикация 2 после окончания воздействия дышали атмосферным воздухом.

Животных групп «ИВЛ» и «ПДКВ» через час после воздействия вводили в анестезию путём инфузии растворов тилетамина+золазепама (Золетил 100, Virbak, Франция, 15 мг/кг, внутривенно) и пипекурония бромида (1 мг, внутривенно). После достижения седации и миорелаксации осуществляли интубацию трахеи (трубка № 2,5-3,0 с манжетой). Искусственную вентиляцию

лёгких проводили при помощи аппаратов ИВЛ Mindray SynoVent E3 (Китай) в режиме принудительной вентиляции с контролем по давлению. У кроликов группы «ИВЛ» вентиляцию осуществляли с параметрами: фракция кислорода во вдыхаемом воздухе ( $FiO_2$ ) – 0,3, давление поддержки – 14–16 см вод. ст., частота дыхания – 35–40×мин<sup>-1</sup>. Кроликам группы «ПДКВ» начало вентиляции осуществляли с параметрами:  $FiO_2$  – 0,3, положительное давление в конце выдоха – 5 см вод. ст., давление поддержки – 17–19 см вод.ст., частота дыхания – 35–40 мин<sup>-1</sup>. В обоих случаях дыхательный объём составлял 20–25 мл, а минутный объём дыхания – 0,7–1,0 л/мин, что соответствовало физиологическим значениям для кроликов. Кроликам группы «ПДКВ» по мере снижения сатурации гемоглобина артериальной крови ( $SaO_2$ ) ниже 90 % осуществляли увеличение ПДКВ на 2 см вод.ст., сохраняя заданный дыхательный объём.

Поддержание анестезии осуществляли инфузией тилетамина+золазепам (Золетил 100, Virbak, Франция, 5 мг×час/кг внутривенно при помощи инфузомата) и пипекурония бромид (0,5 мг внутривенно, при появлении спонтанного дыхания). Через 14 ч после воздействия выживших кроликов группы «ПДКВ» на фоне восстановления спонтанного дыхания экстубировали, после чего они дышали атмосферным воздухом ( $FiO_2$  – 0,21).

Непосредственно перед воздействием (фон) и на протяжении 16 ч после воздействия у кроликов анализировали  $SaO_2$  при помощи ветеринарного монитора Mindray uMEC12vet (Китай). Через 5 ч после воздействия выполняли анализ газового состава артериальной крови при помощи стационарного биохимического анализатора EasyStat (США). В качестве интегрального параметра рассчитывали  $PaO_2/FiO_2$  (отношение парциального давления кислорода в артериальной крови к фракции кислорода во вдыхаемом воздухе) [4]. Непосредственно перед воздействием (фон) и на пятом часу постинтоксикационного периода выполняли компьютерную томографию груди кроликов на компьютерном томографе Philips MX 16-slice (США). Всем животным перед воздействием (фон), выжившим животным на 7 сут после воздействия выполняли рентгенографическое исследование органов грудной клетки при помощи ветеринарного рентгеновского аппарата Sedecal Neovet F (Испания).

Полученные экспериментальные данные выражали в виде медианы, первого и третьего квартилей ( $Me$  [ $Q_1$ ;  $Q_3$ ]), показатели выживаемости – в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ( $S \pm x_s$ ). Для сравнения двух и более независимых групп использовали критерий Краскела–Уолиса и критерий

Ньюмана–Кейлса. Динамику гибели животных отражали в графике Каплана–Майера. Среднюю продолжительность жизни сравнивали при помощи критерия Гехана–Уилкоксона. О значимости различий между группами судили при уровне  $p$  менее 0,05.

## Результаты

Воздействие на лабораторных животных продуктами термодеструкции фторопласта-4 не оказывало раздражающего действия. При анализе состава газовой смеси в ингаляционной камере определили перфторизобутилен, медиана концентрации которого составила 0,23 г/м<sup>3</sup>, монооксид углерода в концентрации 0,11 [0,09; 0,12] г/м<sup>3</sup>, кислород в концентрации – 20,8 [20,6; 20,9] %.

В течение первых 3–х ч после воздействия видимых проявлений интоксикации выявлено не было. Через 3 ч после ингаляции продуктов термодеструкции у кроликов групп Интоксикация 1, «ИВЛ» и Интоксикация 2 определили снижение  $SaO_2$ . У кроликов, получавших в качестве лечения ИВЛ с ПДКВ (группа «ПДКВ»),  $SaO_2$  была выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с кроликами группы Интоксикация 2. В дальнейшем у кроликов групп Интоксикация 1, «ИВЛ» и Интоксикация 2 определили ещё большее снижение  $SaO_2$ . За 30 мин до формирования летального исхода у животных  $SaO_2$  была ниже 76 %.

У кроликов группы «ПДКВ» снижение  $SaO_2$  до 90 % определили только через 6 ч после воздействия. Увеличение ПДКВ на 2 см вод. ст. (при сохранении заданного дыхательного объёма) приводило к нормализации  $SaO_2$  (рис. 1, а/а).

Через 5 ч после воздействия всем кроликам осуществляли анализ газового состава артериальной крови. У кроликов групп Интоксикация 1 и Интоксикация 2 определили выраженную артериальную гипоксемию (снижение ( $p < 0,05$ )  $PaO_2/FiO_2$ ) и гиперкапнию (увеличение ( $p < 0,05$ )  $pCO_2$ ) по сравнению с контролем. У животных группы Интоксикация 2 определили снижение ( $p < 0,05$ ) рН по сравнению с контролем. Применение ИВЛ (группа «ИВЛ») не способствовало нормализации  $PaO_2/FiO_2$ . У кроликов, которым выполняли ИВЛ с ПДКВ (группа «ПДКВ»)  $PaO_2/FiO_2$  был ниже по сравнению с контролем, но выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем животных группы Интоксикация 2, изменений рН не выявлено (см. табл.).

После исследования газового состава артериальной крови кроликам выполняли компьютерную томографию груди. При проведении фонового исследования на компьютерных томограммах лёгких патологических изменений не выявлено.

У кроликов групп Интоксикация 1, Интоксикация 2 (томограммы на рисунке не приведены) на томограммах определили участки инфильтративных изменений легочной паренхимы за счёт альвеолярного отёка преимущественно справа в каудальных отделах. У кроликов группы «ИВЛ» на томограммах определили субтотальные инфильтративные изменения лёгочной паренхимы обоих лёгких. У кроликов группы «ПДКВ» на томограммах в каудальных отделах преимущественно справа определили локальные участки уплотнения легочной паренхимы по типу «матового стекла» (рис. 2).

У кроликов № 1 и 4 (группа «ПДКВ») через 8 и 10 ч после воздействия, соответственно, определили снижение SaO<sub>2</sub>, последующее увеличение ПДКВ на 2 см вод. ст. способствовало нормализации исследуемого параметра (рис. 1, б/б). Через 10 и 12 ч после воздействия у кроликов № 1 и 4 (группа «ПДКВ») произошло снижение сатурации, увеличение ПДКВ не способствовало нормализации состояния. Летальные исходы у кро-

ликов № 1 и 4 (группа «ПДКВ») произошли через 10,5 и 12,5 ч после воздействия (рис. 3).

Через 14 ч после воздействия на фоне восстановления спонтанного дыхания кроликов № 2 и 3 (группа «ПДКВ») экстубировали и перевели на самостоятельное дыхание (FiO<sub>2</sub>-0,21). В ходе последующего наблюдения (через 15 и 16 ч после воздействия) было показано, что SaO<sub>2</sub> кроликов № 2 и 3 (группа «ПДКВ») не отличалась от фоновых значений (рис. 1, б).

Средняя продолжительность жизни кроликов группы Интоксикация 1 составила 4,5 [4,4; 4,7] ч. Применение ИВЛ (группа «ИВЛ») не приводило к увеличению средней продолжительности жизни животных (5,1 [4,6; 5,5] ч). В свою очередь применение ИВЛ с ПДКВ (группа «ПДКВ») приводило к увеличению (p=0,024) этого показателя по сравнению с кроликами группы Интоксикация 2 (рис. 3).

Выживаемость кроликов в группах Интоксикация 1, «ИВЛ» и Интоксикация 2 составила 0+25 %, а в группе «ПДКВ» – 50±29 %. В силу ограниченности

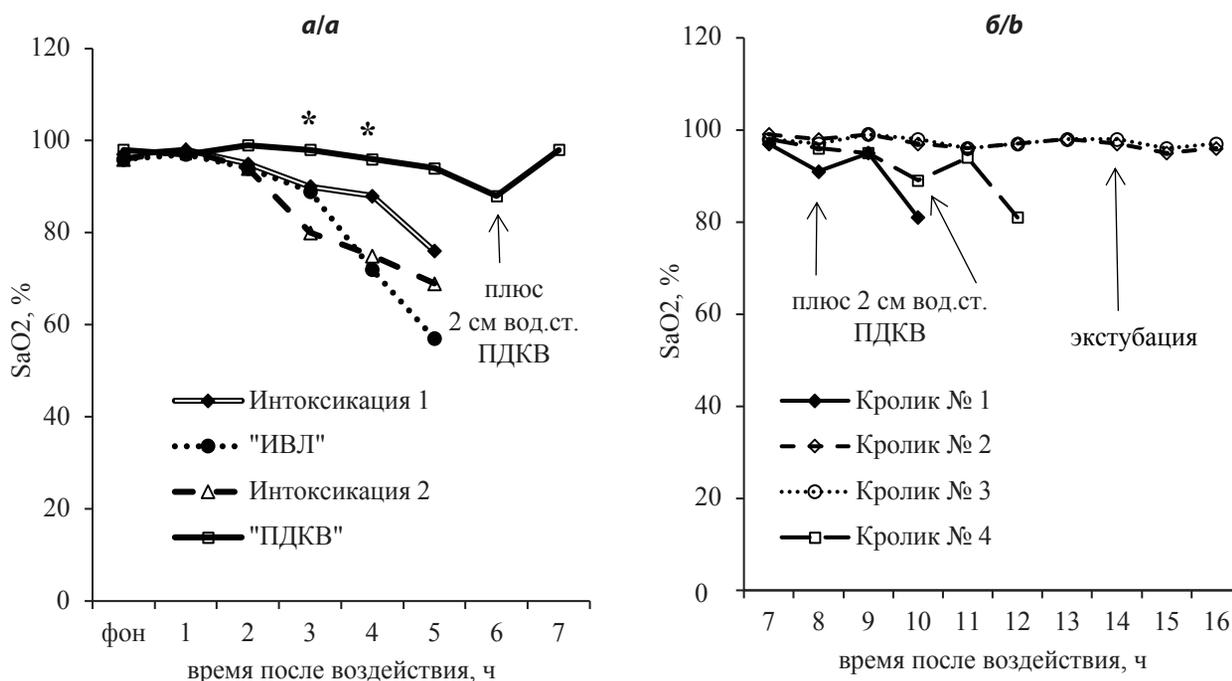


Рис. 1. Динамика сатурации гемоглобина артериальной крови.

а – динамика сатурации гемоглобина артериальной крови (SaO<sub>2</sub>) кроликов после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта-4 (2 HLC<sub>50</sub>) на фоне проведения ИВЛ и ИВЛ с ПДКВ, % (Me); б – динамика SaO<sub>2</sub> кроликов группы «ПДКВ» с 7 ч после воздействия, % (абсолютные значения).

Fig. 1. Dynamics of hemoglobin saturation in arterial blood.

а – dynamics of arterial blood hemoglobin saturation (SaO<sub>2</sub>) in rabbits after exposure to thermal degradation products of the fluoroplast-4 (2 HLC<sub>50</sub>) against the background of ventilation and ventilation with PEEP, % (Me); б – dynamics of SaO<sub>2</sub> in rabbits of the «PEEP» group from 7 h after exposure, % (absolute values).

(по численности) выборки значимых различий по выживаемости между животными исследуемых групп получено не было (рис. 3).

За выжившими кроликами группы «ПДКВ» наблюдали в течение 7 сут, их состояние не отличалось от состояния животных группы Контроль. На 7 сут после воздействия  $\text{SaO}_2$  составила 98 и 97 %,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  – 358 и 372. При проведении рентгенографии органов грудной клетки выявили умеренное усиление лёгочного рисунка за счёт сосудистого компонента, инфильтративных изменений не обнаружено (рис. 4).

### Обсуждение

В выполненном экспериментальном исследовании продемонстрирована эффективность проведения ИВЛ с ПДКВ для коррекции состояния кроликов с токсическим отёком лёгких, вызванным интоксикацией продуктами термодеструкции фторопласта-4, обладающими пульмонотоксическим действием.

При анализе газовой смеси в ингаляционной камере определили перфторизобутилен, содержание которого соответствовало двум средним летальным концентрациям [9], содержание монооксида углерода – одной десятой средней летальной концентра-

ции для крыс [10]. Снижение содержания кислорода (до 20,6 %) не приводило к гипоксической гипоксии. Таким образом, тяжесть состояния животных была обусловлена в первую очередь ингаляционным воздействием перфторизобутилена, обладающего ацилирующим действием [5, 7].

Ингаляционное воздействие продуктов термодеструкции фторопласта-4, содержащих перфторизобутилен, приводило к формированию токсического отёка лёгких, первые проявления которого определили через 3 ч после воздействия (снижение  $\text{SaO}_2$ ). При анализе компьютерных томограмм груди кроликов, не получавших лечение (группы Интоксикация 1 и Интоксикация 2) определили признаки, характерные для альвеолярной фазы токсического отёка лёгких. Накопление жидкости в просвете альвеол способствовало нарушению газообмена. Так, через 5 ч после воздействия у кроликов определили выраженную артериальную гипоксемию и гиперкапнию, сопровождающуюся респираторным ацидозом. Летальные исходы кроликов, не получавших лечение (группы Интоксикация 1 и Интоксикация 2) происходили с 4 по 6 ч после воздействия. Выявленные проявления свидетельствуют о крайне тяжёлой степени интокси-

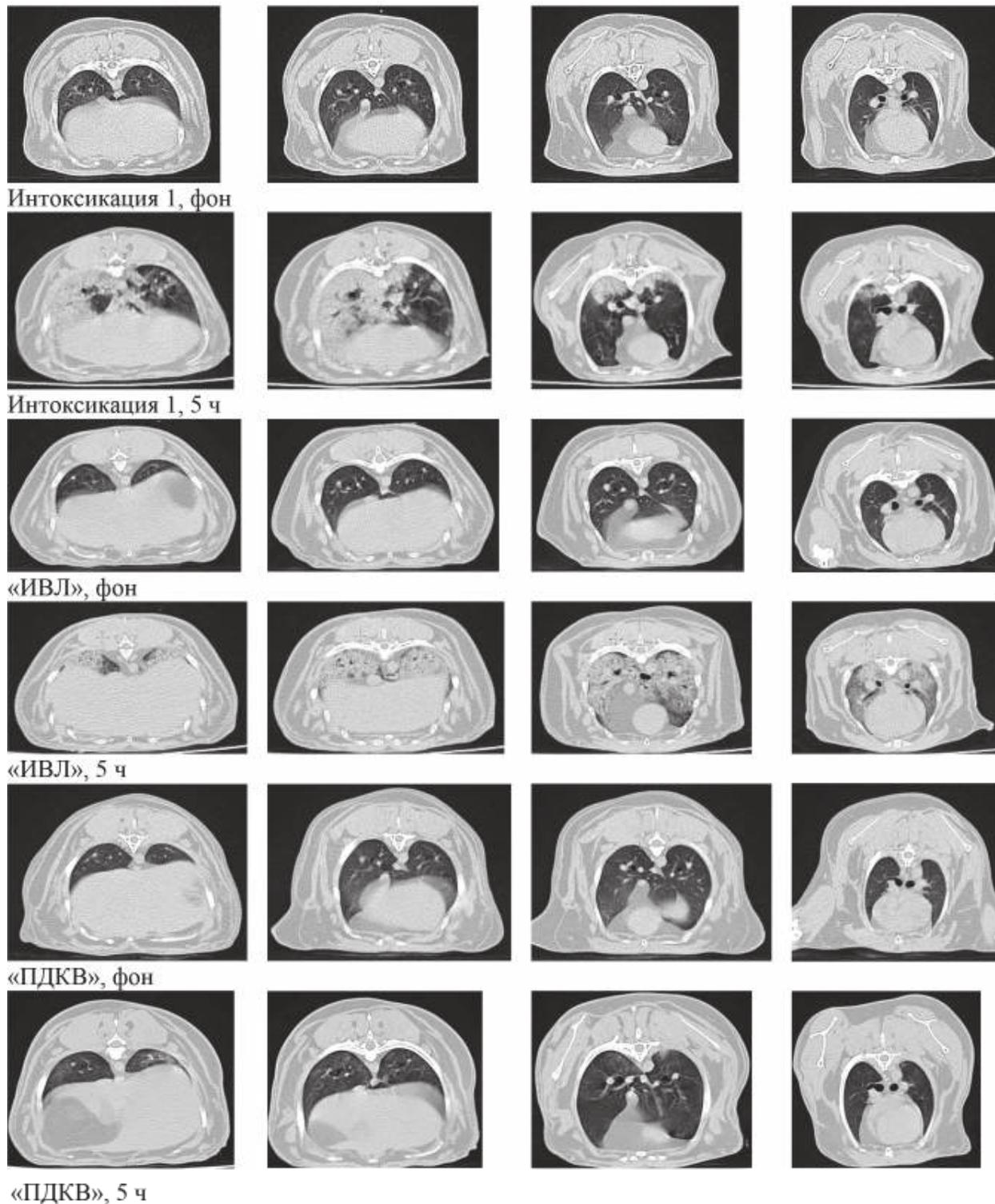
**Показатели газового состава артериальной крови кроликов через 5 ч после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта-4 (2 HLC<sub>50</sub>) на фоне проведения ИВЛ и ИВЛ с ПДКВ, (Ме [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>])**

**Indicators of the gas composition of arterial blood of rabbits 5 hours after exposure to thermal degradation products of fluoroplast-4 (2 HLC<sub>50</sub>) against the background of ventilation and ventilation with PEEP, (Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>])**

Показатель	Группа животных				
	Контроль ( $\text{FiO}_2 - 0,21$ )	Интоксикация 1 ( $\text{FiO}_2 - 0,21$ )	«ИВЛ» ( $\text{FiO}_2 - 0,3$ )	Интоксикация 2 ( $\text{FiO}_2 - 0,21$ )	«ПДКВ» ( $\text{FiO}_2 - 0,3$ )
pH	7,28 [7,24; 7,32]	7,22 [7,17; 7,24]	7,29 [7,25; 7,32]	7,19 [7,18; 7,21]**	7,31 [7,28; 7,33]
pCO <sub>2</sub> мм рт. ст.	43 [40; 46]	56 [49; 61]*	47 [45; 51]	58 [52; 64]**	44 [41; 48]
pO <sub>2</sub> мм рт. ст.	77 [73; 80]	62 [59; 66]*	50 [47; 54]*	40 [38; 42]**	76 [74; 79]
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	367 [351; 383]	295 [285; 314]*	167 [158; 180]*	190 [181; 198]**	253 [247; 262]*
Hct, %	36 [34; 37]	38 [37; 39]	38 [36; 39]	45 [43; 46]**	36 [35; 37]
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мм/л	22,9 [22,7; 23,1]	23,5 [22,1; 24]	23,1 [23; 23,4]	21,1 [20,7; 21,4]	23,1 [22,8; 23,2]
BEect, мм/л	-3,6 [-3,6; -3,4]	-1,9 [-2,3; -1,9]	-3,1 [-3,2; -2,8]	-2,3 [-2,7; -2]	-3,1 [-3,5; -3]

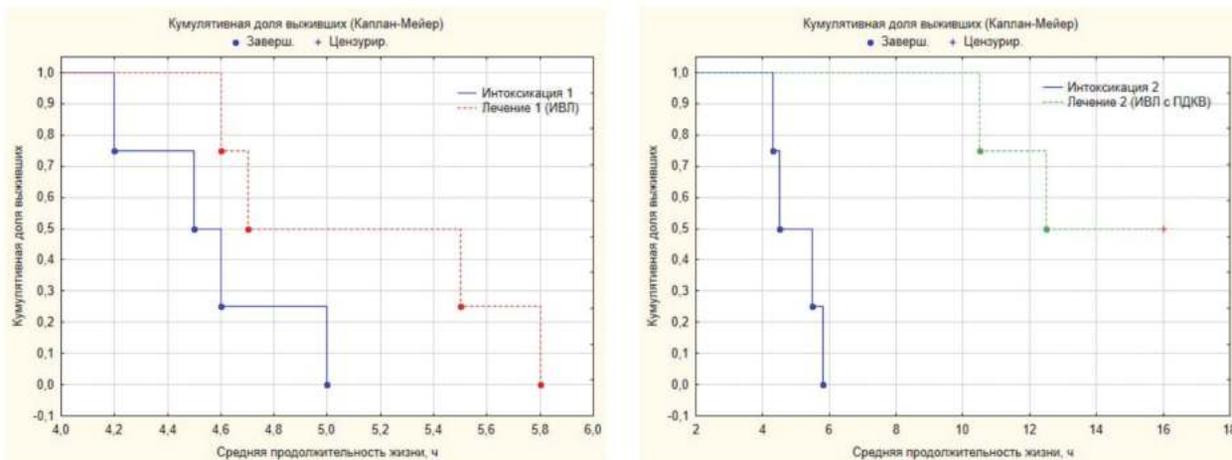
**Примечание.** \* – различия значимы по сравнению с группой «ПДКВ»,  $p < 0,05$ ; # – различия значимы по сравнению с группой Контроль,  $p < 0,05$ ; в каждой группе,  $n = 4$ .

**Note.** \* – differences are significant compared to the «PEEP» group,  $p < 0.05$ ; # – differences are significant compared to the Control group,  $p < 0.05$ ; in each group,  $n = 4$ .



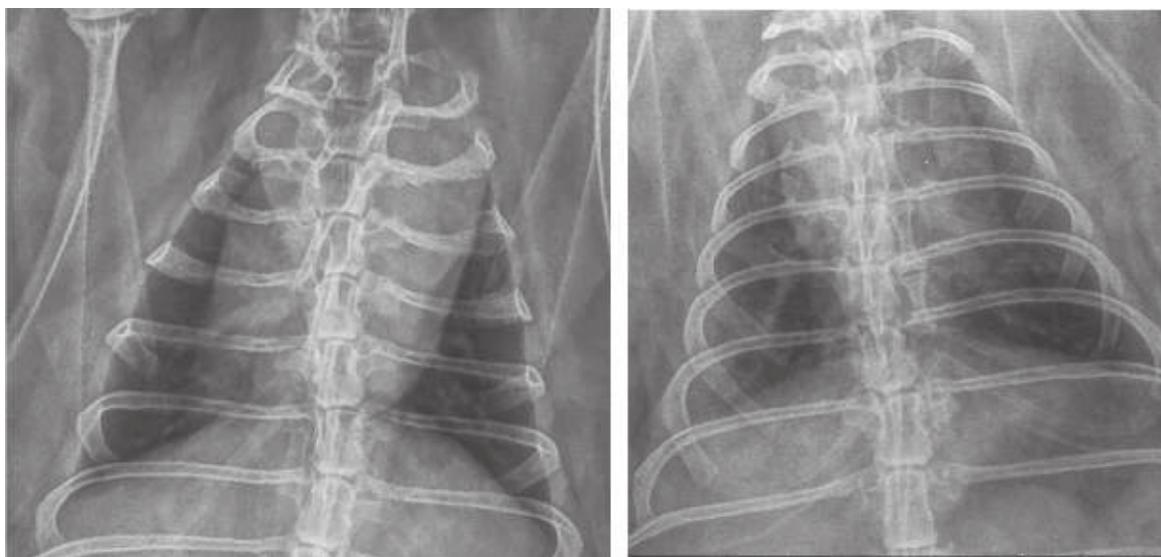
**Рис. 2.** Компьютерные томограммы груди кроликов в различные сроки после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта-4 (2 HLC<sub>50</sub>) на фоне проведения ИВЛ и ИВЛ с ПДКВ. «Фон» – компьютерные томограммы выполнены перед моделированием интоксикации.

**Fig. 2.** Computed tomograms of rabbit breasts at various times after exposure to thermal degradation products of fluoroplast-4 (2 HLC<sub>50</sub>) against the background of ventilation and ventilation with PEEP. «Background» computed tomograms were performed before modeling intoxication.



**Рис. 3.** Динамика гибели кроликов, на фоне применения ИВЛ и ИВЛ с ПДКВ после тяжёлой интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4 (2 HLC<sub>50</sub>), ч, графики Каплана–Майера.

**Fig. 3.** Dynamics of rabbit death, against the background of the use of ventilators and ventilators with PEEP after severe intoxication with products of thermal degradation of fluoroplast-4 (2 HLC<sub>50</sub>), hours, Kaplan–Mayer graphs.



«ПДКВ», фон

«ПДКВ», 7 сут

**Рис. 4.** Рентнограммы органов грудной клетки кролика в прямой проекции, получавшего ИВЛ с ПДКВ, на 7 сут после воздействия продуктов термодеструкции фторопласта-4 (2 HLC<sub>50</sub>).

**Fig. 4.** X-rays of the chest organs of a rabbit in direct projection, receiving ventilation with PEEP, for 7 days after exposure to thermal degradation products of fluoroplast-4 (2 HLC<sub>50</sub>).

кации животных [4, 11]. В качестве ведущей причины летального исхода кроликов следует рассматривать центральное угнетение дыхания и кровообращения, вызванного артериальной гипоксемией и респираторным ацидозом [12].

Согласно данным литературы проведение респираторной поддержки может быть эффективным подходом для коррекции токсического отёка лёгких [2, 6], однако, экспериментальные подтверждения данного подхода весьма ограничены [13]. Поэтому в первую

очередь оценили эффективность проведения ИВЛ для коррекции токсического отёка лёгких.

В ходе исследований установили, что проведение ИВЛ без ПДКВ было не эффективно, поскольку определили схожую динамику снижения  $\text{SaO}_2$  с животными, не получавшими лечение, через 5 ч после воздействия выявили признаки альвеолярного отёка (при проведении компьютерной томографии), артериальную гипоксемию и гиперкапнию. Различий по средней продолжительности жизни с кроликами, не получавшими лечение (группа Интоксикация 1), не обнаружили.

Проведение ИВЛ с ПДКВ обладало выраженным защитным эффектом. Так снижение  $\text{SaO}_2$  выявили только через 6 ч после воздействия, а увеличение ПДКВ на 2 см вод. ст. (при сохранении заданного дыхательного объёма) способствовало нормализации оксигенации крови. При проведении компьютерной томографии груди у кроликов определили признаки только интерстициальной фазы отёка лёгких, без выраженных нарушений оксигенации, в то время как у кроликов, не получавших лечение, определили картину альвеолярной фазы отёка с признаками артериальной гипоксемии и гиперкапнии. Защитное действие ИВЛ с ПДКВ может быть связано с тем, что положительное давление в дыхательных путях приводит к увеличению давления в альвеолах, что, в свою очередь, создавая «заклинивающее» давление, препятствует избыточному притоку жидкости из интерстиция. Расправление коллабированных альвеол за счёт увеличения давления в дыхательных путях способствует увеличению альвеолярной вентиляции и улучшению газообмена [4, 13, 14]. Важно отметить, что защитный эффект был обусловлен именно поддержанием ПДКВ, в то время как проведение ИВЛ без ПДКВ было не эффективно.

Применение ИВЛ с ПДКВ способствовало увеличению ( $p=0,024$ ) средней продолжительности жизни кроликов. Тем не менее, два кролика, получавших в качестве лечения ИВЛ с ПДКВ, погибли через 10,5 и 12,5 ч. По-видимому, защитного действия ПДКВ было недостаточно на фоне манифестации токсического отёка лёгких при крайне тяжёлой степени интоксикации. В тоже время два других кролика выжили и у них на 7 сут после воздействия нарушений газообмена и патологических изменений в лёгких не выявили. Можно предположить, что устойчивость этих кроликов обусловлена защитным действием ПДКВ на фоне которого достигнуты изменения функционально состояния, достаточные для поддержания жизнедеятельности в условиях прогрессирования токсического

отёка лёгких при крайне тяжёлой степени интоксикации продуктами термодеструкции фторопласта-4, содержащими перфторизобутилен.

### Заключение

Применение ИВЛ с ПДКВ эффективно для коррекции токсического отёка лёгких у кроликов, вызванного крайне тяжёлой интоксикацией продуктами термодеструкции фторопласта-4, содержащими перфторизобутилен, причём защитное действие обусловлено именно созданием положительного давления в конце выдоха. Применение ИВЛ с ПДКВ может быть эффективным подходом для лечения токсического отёка лёгких различного генеза.

### Литература

(п.п. 5; 7; 8; 13; 14 см. References)

1. Башарин В.А., Чепур С.В., Толкач П.Г., Венгерович Н.Г., Юдин М.А., Никифоров А.С. и др. *Токсикология пульмонотоксикантов*. СПб.: ООО Издательство «Левша. Санкт-Петербург»; 2021. <https://elibrary.ru/item.asp?id=46214467>
2. Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В., Харитонов М.А., Толкач П.Г., Юдин М.А. и др. Роль и место респираторной поддержки в схемах терапии острого легочного отёка, вызванного ингаляционным воздействием токсичных веществ. *Военно-медицинский журнал*. 2019; (11): 26-32. <https://elibrary.ru/item.asp?id=41344935>
3. Тришкин Д.В., Чепур С.В., Толкач П.Г., Башарин В.А., Чубарь О.В., Гоголевский А.С. и др. Пульмонотоксичность продуктов горения синтетических полимеров. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2018; 38(4): 114-20. <https://doi.org/10.15372/SSMJ20180415>
4. Ярошецкий А.И., Грицан А.И., Авдеев С.Н., Власенко А.В., Ерёмченко А.А., Заблотских И.Б. и др. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома. *Анестезиология и реаниматология*. 2020; (2): 5-39. <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology20200215>
6. Чепур С.В., Чубарь О.В., Халимов Ю.Ш., Акимов А.Г., Храпов К.Н., Юдин М.А. и др. *Методические рекомендации по терапии дыхательной недостаточности у пораженных отравляющими и высокотоксичными веществами на этапах медицинской эвакуации*. ГВМУ МО РФ; 2016. <https://elibrary.ru/item.asp?id=45591592>
9. Толкач П.Г., Башарин В.А., Чепур С.В., Потапов П.К., Сизова Д.Т., Димитриев Ю.В. Оценка эффективности седативных препаратов для коррекции токсического отёка лёгких у лабораторных животных при интоксикации продуктами пиролиза фторопласта-4. *Успехи современной биологии*. 2021; 141(1): 32-9. <https://doi.org/10.31857/S0042132421010245>
10. Завирский А.В., Зацепин В.В., Башарин В.А., Толкач П.Г., Мешков С.А. Экспериментальная модель комбинированного радиационно-химического поражения в результате воздействия рентгеновского излучения и монооксида углерода. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2020; (21): 11-22. <https://elibrary.ru/item.asp?id=43804821>
11. Мороз В.В., Голубев А.М. Классификация острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология*. 2007; 3(6): 5-6. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2007-6-7-9>

12. Зверев М.И., Анестиади М.Я. *Токсический отёк лёгких*. Ред. М.В. Бочкарёв. Кишинёв: «Штиинца». 1981.

### References

- Basharin V.A., Chepur S.V., Tolkach P.G., Vengerovich N.G., Nikiforov A.S., Yudin M.A., et al. *Toxicology of pulmonotoxicants. [Toksikologiya pul'monotoksikantov]*. Saint-Petersburg: ООО Izdatel'stvo «Levsha. Sankt-Peterburg», 2021. <https://elibrary.ru/item.asp?id=46214467> (in Russian)
- Basharin V.A., Chepur S.V., Shchegolev A.V., Kharitonov M.A., Tolkach P.G., Yudin M.A., et al. The role and place of respiratory support in treatment regimens for acute pulmonary edema caused by inhalation exposure to toxic substances. *Voennomeditsinskii zhurnal*. 2019; 340(11): 26-32. <https://elibrary.ru/item.asp?id=41344935> (in Russian)
- Trishkin D.V., Chepur S.V., Tolkach P.G., Basharin V.A., Chubar O.V., Gogolevskiy A.S., et al. Pulmonotoxicity of synthetic polymers combustion products. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal*. 2018; 38(4): 114-20. <https://doi.org/10.15372/SSMJ20180415> (in Russian)
- Yaroshetskiy A.I., Gritsan A.I., Avdeev S.N., Vlasenko A.V., Eremenko A.A., Zabolotskiy I.B., et al. Diagnostics and intensive therapy of respiratory failure in those affected by poisonous and highly toxic substances at the stages of medical evacuation. *[Metodicheskie rekomendatsii po terapii dykhatel'noi nedostatochnosti u porazhennykh otravlyayushchimi i vysokotoksichnymi veshchestvami na etapakh meditsinskoi evakuatsii]*. GNII VM MO RF. Saint-Petersburg: 2016. <https://elibrary.ru/item.asp?id=45591592> (In Russian)
- Patocka J. Perfluoroisobutene: poisonous choking gas. *Mil. Med. Sci. Lett.* 2019; 88(3): 98-105. <https://doi.org/10.31482/mmml.2019.006>
- Chepur S.V., Chubar O.V., Khalimov Yu.Sh., Akimov A.G., Khrapov K.N., Yudin M.A., et al. Methodological recommendations for the treatment of respiratory failure in those affected by poisonous and highly toxic substances at the stages of medical evacuation. *[Metodicheskie rekomendatsii po terapii dykhatel'noi nedostatochnosti u porazhennykh otravlyayushchimi i vysokotoksichnymi veshchestvami na etapakh meditsinskoi evakuatsii]*. GNII VM MO RF. Saint-Petersburg: 2016. <https://elibrary.ru/item.asp?id=45591592> (In Russian)
- Zhang Y.L., Fan L., Xi R., Zhonghua M., Dan S., Ding D., et al. Lethal concentration of perfluoroisobutylene induced acute lung injury in mice mediated via cytokins storm, oxidative stress and apoptosis. *Inhal. Toxicol.* 2017; 29(6): 255-65. <https://doi.org/10.1080/08958378.2017.1357772>
- Holmes W.W., Keyser B.M., Paradiso D.C., Radharaman R., Devon K.A., Betty J.B., et al. Conceptual approaches for treatment of phosgene inhalation-induced lung injury. *Toxicol. Lett.* 2016; 244: 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.010>
- Tolkach P.G., Basharin V.A., Chepur S.V., Potapov P.K., Sizova D.T., Dimitriev Yu.V. Evaluation of the effectiveness of sedative medicals for the correction of toxic pulmonary edema during intoxication products of pyrolysis of fluoroplast-4. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2021; 141(1): 32-9. <https://doi.org/10.31857/S0042132421010245> (In Russian)
- Zavirsky A.V., Zatselin V.V., Basharin V.A., Tolkach P.G., Meshkov S.A. Experimental model of combined radiation-chemical injury after exposure of x-ray radiation and intoxication by carbon monoxide. *Medline.ru. Rossiyskii biomeditsinskii zhurnal*. 2020; (21): 11-22. <https://elibrary.ru/item.asp?id=43804821> (In Russian)
- Moroz V.V., Golubev A.M. Classification of acute respiratory distress syndrome. *Obshchaya reanimatologiya*. 2007; 3(6): 7-9. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2007-6-7-9> (in Russian)
- Zverev M.I., Anestiadi M.Ya. *Toxic pulmonary edema. [Toksicheskiy otok lyogkikh]*, ed. M.V. Bochkaryov. Kishinyov: «Shtiinca». 1981. (in Russian)
- Mistry S., Scott T.E., Jugg B.J., Rosi P., Sina S., Declan G.B. An in-silico porcine model of phosgene-induced lung injury predicts clinically relevant benefits from application of continuous positive airway pressure up to 8 h post exposure. *Toxicol Lett.* 2024; 391: 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.12.005>
- Graham S., Fairhall S., Rutter S., Philippa A., Rachel R., Adam S. et al. Continuous positive airway pressure: an early intervention to prevent phosgene-induced acute lung injury. *Toxicol. Lett.* 2018; 293: 120-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.001>

### Сведения об авторах:

**Башарин Вадим Александрович**, доктор мед. наук, проф., начальник каф. военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» Минобороны России, e-mail: basharin1@mail.ru;

**Чепур Сергей Викторович**, доктор мед. наук проф., начальник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины», e-mail: svch-spb@mail.ru;

**Щёголев Алексей Валерианович**, доктор мед. наук проф., начальник каф. военной анестезиологии и реаниматологии ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» Минобороны России, e-mail: alexeischegolev@gmail.com;

**Харитонов Михаил Анатольевич**, доктор мед. наук проф., 1 каф. и клиники (терапии усовершенствования врачей) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» Минобороны России, e-mail: micjull1@yandex.ru;

**Толкач Павел Геннадьевич**, доктор мед. наук, зам. начальника каф. военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» Минобороны России, e-mail: pgtolkach@gmail.com;

**Ярошенко Дмитрий Михайлович**, адъюнкт каф. военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» Минобороны России, e-mail: yaroshenko-spb@yandex.ru;

**Арсентьев Леонид Вадимович**, канд. мед. наук, преподаватель каф. и клиники военной анестезиологии и реаниматологии ФГБВОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» Минобороны России, e-mail: arsentevlvmd@gmail.com;

**Грачёва Галина Юрьевна**, ветеринарный врач-реаниматолог, «Ветеринарная клиника онкологии, травматологии и интенсивной терапии доктора Сотникова», e-mail: grachevaicuvet@mail.ru;

**Илатовская Юлия Дмитриевна**, ветеринарный врач-реаниматолог, «Ветеринарная клиника онкологии, травматологии и интенсивной терапии доктора Сотникова», e-mail: yulia.icu@mail.ru

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092.4

**Морозов И.А., Годовалов А.П., Баяндина С.Г.****Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию иммуноглобулинов класса G в культуре мононуклеарных лейкоцитов практически здоровых доноров**

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26

Полиамины, синтезируемые микроорганизмами в ходе метаболизма аминокислот, оказывают разносторонний эффект на врожденный иммунитет. Так, путресцин и кадаверин способны ингибировать фагоцитарную активность мононуклеарных лейкоцитов, выполнять роль «скавенджера» гидроксильных радикалов в очаге воспаления. Однако в современной литературе нет однозначных данных касательно влияния полиаминов бактериального происхождения на подсистему адаптивного иммунитета. **Цель исследования** – оценить влияние кадаверина и путресцина на продукцию иммуноглобулина G в культуре мононуклеарных лейкоцитов практически здоровых доноров.

**Методика.** Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови 15 практически здоровых доноров. В качестве В-клеточного стимулятора использовали митоген лаконоса PWM. Кадаверин и путресцин использовали в конечных концентрациях 5, 25, 50, 75 и 100 ммоль/л. По окончании срока инкубации определяли концентрацию иммуноглобулинов G с помощью иммуноферментного метода.

**Результаты.** Выявлена прямая зависимость между концентрацией кадаверина и путресцина в пробах и уровнем иммуноглобулинов G ( $r=0,92$  и  $r=0,98$  соответственно,  $p<0,05$ ). Оба полиамина оказывали стимулирующее влияние на продукцию IgG только в концентрациях 75 и 100 ммоль/л. Так, при 75 ммоль/л кадаверина уровень иммуноглобулинов составил 17,8 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,047$  к контрольным образцам), а при 100 ммоль/л – 21,8 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,001$  к контрольным образцам). При концентрации путресцина 75 ммоль/л уровень иммуноглобулинов составил 18,9 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,004$  к контрольным образцам), а при 100 ммоль/л – 20,6 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,003$  к контрольным образцам).

**Заключение.** Выявлено что бактериальные метаболиты путресцин и кадаверин обладают стимулирующим влиянием на продукцию иммуноглобулинов класса G лимфоцитами.

**Ключевые слова:** полиамины; путресцин; кадаверин; иммуноглобулин G

**Для цитирования:** Морозов И.А., Годовалов А.П., Баяндина С.Г. Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию иммуноглобулинов класса G в культуре мононуклеарных лейкоцитов практически здоровых доноров.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 34–37.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.34-37

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

**Для корреспонденции:** Морозов Илья Андреевич, e-mail: doc.morozov@hotmail.com

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

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

Поступила 10.10.2024

Принята в печать 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

**Morozov I.A., Godovalov A.P., Bayandina S.G.****The effect of bacterial polyamines on the production of the class G immunoglobulins in the culture of mononuclear leukocytes from healthy donors**E.A. Vagner Perm State Medical University,  
26 Petropavlovskaya str., Perm, 614990, Russian Federation

Polyamines synthesized by microorganisms during the metabolism of amino acids have a versatile effect on the innate immune system. Thus, putrescine and cadaverine are able to inhibit the phagocytic activity of mononuclear leukocytes, and act as a “scavenger” of hydroxyl radicals in the focus of inflammation. However, there is no unambiguous data in the modern literature regarding the effect of polyamines of bacterial origin on the subsystem of adaptive immunity. **The aim of the study** was to evaluate the effect of cadaverine and putrescine on the production of immunoglobulin G in the culture of mononuclear leukocytes from practically healthy donors.

**Methods.** The object of the study was peripheral venous blood leukocytes from 15 practically healthy donors. Laconose mitogen PWM was used as a B-cell stimulator. Cadaverine and putrescine were used in final concentrations of 5, 25, 50, 75 and 100 mmol/l. At the end of the incubation period, the concentration of immunoglobulins G was determined using the enzyme immunoassay method.

**Results.** A direct relationship was revealed between the concentration of cadaverine and putrescine in the samples and the level of immunoglobulins G ( $r=0.92$  and  $r=0.98$ , respectively,  $p<0.05$ ). Both polyamines had a stimulating effect on IgG production only at concentrations of 75 and 100 mmol/L. Thus, at 75 mmol/l of cadaverine, the level of immunoglobulins was 17.8 IU per 1 mg of protein ( $p=0.047$  for control samples), and at 100 mmol/l – 21.8 IU per 1 mg of protein ( $p=0.001$  for control samples). At a putrescine concentration of 75 mmol/l, the immunoglobulin level was 18.9 IU per 1 mg of protein ( $p=0.004$  for control samples), and at 100 mmol/l – 20.6 IU per 1 mg of protein ( $p=0.003$  for control samples).

**Conclusion.** It was found that the bacterial metabolites putrescine and cadaverine have a stimulating effect on the production of class G immunoglobulins by lymphocytes.

**Keywords:** polyamines; putrescine; cadaverine; immunoglobulin G

**For citation:** Morozov I.A., Godovalov A.P., Bayandina S.G. The effect of bacterial polyamines on the production of the class G immunoglobulins in the culture of mononuclear leukocytes from healthy donors. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 34-37. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.34-37

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

**Information about the authors:**

Godovalov A.P., <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Morozov I.A., <https://orcid.org/0000-0003-4233-3711>

Bayandina S.G., <https://orcid.org/0009-0004-2546-3690>

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

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

Received 10.10.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

В ранее проведенных исследованиях показано влияние полиаминов, образующихся в результате разложения белков бактериями, на клеточное звено врожденного иммунитета [1]. Так установлено, что кадаверин и путресцин ингибируют функциональную (поглотительную) активность лейкоцитов [2]. Предполагается, что мишенями действия полиаминов является регуляция экспрессии генов, непосредственно участвующих в этих процессах, так и эффект на системы, осуществляющие межклеточную коммуникацию [3, 4]. Другие исследования показывают, что добавление путресцина в диету повышает активность лизоцима и щелочной фосфатазы, уровня иммуноглобулинов М, а также способствует снижению уровня продукции фактора некроза опухоли- $\alpha$  в кишечном содержимом [5]. Более того, полиамины обуславливают изменение фенотипа макрофагов в М2 и оказывают супрессию толерогенных дендритных клеток [6]. В ряде экспериментов описано ингибирование путресцином и кадаверином продукции интерферона  $\gamma$ , а также увеличение продукции интерлейкина-4 митоген-активированными клетками

[2]. Продемонстрировано участие полиаминов в регуляции активации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов: дефицит орнитиндекарбоксилазы, фермента необходимого для синтеза полиаминов, приводит к нарушению дифференцировки CD4<sup>+</sup> Т-хелперов из-за снижения концентрации субстрата для дезоксирибозинсинтазы [7, 8]. Однако, нет исследований, демонстрирующих влияние кадаверина и путресцина на продукцию иммуноглобулина G (IgG), играющего важную роль в адаптивном иммунном ответе.

**Цель** – оценить влияние кадаверина и путресцина на продукцию иммуноглобулина G в культуре мононуклеарных лейкоцитов практически здоровых доноров.

## Методика

Для исследования использовали лейкоциты периферической венозной крови, полученной от 15 практически здоровых доноров (средний возраст –  $24,0 \pm 0,6$  года). Критериями включения были мужской пол, возраст от 18 до 30 лет, отсутствие хронических заболеваний в стадии обострения, иммунодефицитных состояний.

Лейкоциты отделяли путем градиентного центрифугирования гепаринизированной крови с использованием смеси фиколл-верографин с плотностью 1,078 г/см<sup>3</sup>. После сбора интерфазной части клеточную взвесь перемешивали и трижды отмывали. Для культивирования лимфоцитов использовали микрометод, предполагающий применение пластиковых круглодонных 96-луночных планшетов. Каждая культура содержала 2×10<sup>5</sup> клеток в 0,2 мл полной культуральной среды. Последнюю готовили *ex tempore* на основе среды 199 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве В-клеточного стимулятора использовали митоген лаконоса PWM (2,5 мкг/мл). Кадаверин и путресцин использовали в конечных концентрациях 5, 25, 50, 75 и 100 ммоль/л. Культивирование выполняли во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 288 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость стягивали и замораживали. Концентрации иммуноглобулинов G определяли с помощью иммуноферментного метода набором реагентов производства АО «Вектор-Бест» (Россия).

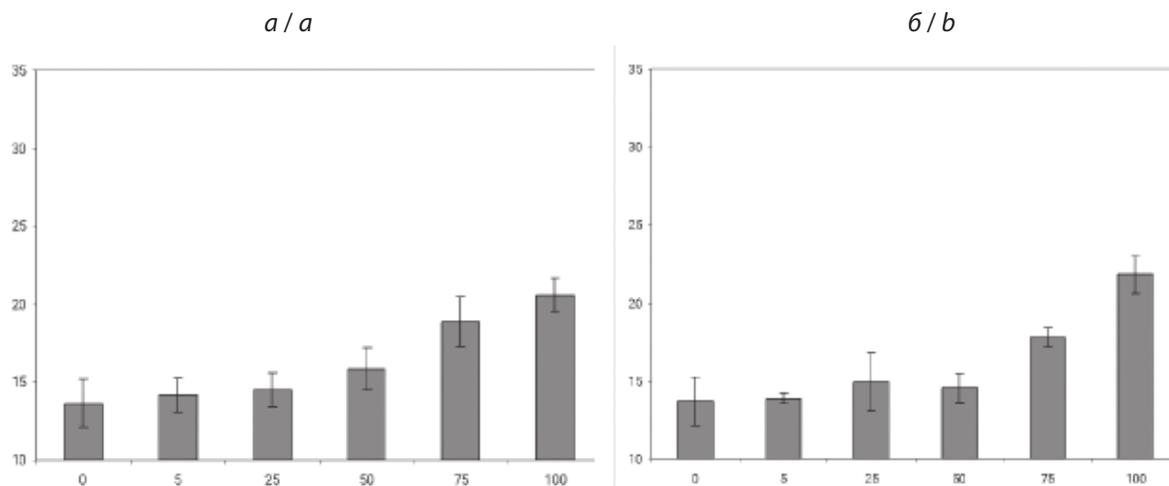
Статистический анализ проводился с помощью программного пакета Statistica 6.0. Вычислялась средняя арифметическая величина (M) и стандартная ошибка средней арифметической (m). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения приближен-

ного к нормальному использовали критерий Стьюдента, в остальных – применяли критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

### Результаты

Выявлена прямая зависимость между концентрацией кадаверина в пробах и уровнем иммуноглобулинов G ( $r=0,92, p<0,05$ ). При дозировках кадаверина 5, 25 и 50 ммоль/л статистического значимого повышения концентрации IgG по сравнению с контрольными образцами не зафиксировано ( $p>0,05$ ; **рис. 1, а/а**). В более высоких концентрациях кадаверин оказывал стимулирующее влияние на продукцию IgG. Так, при 75 ммоль/л уровень иммуноглобулинов составил 17,8 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,047$  к контрольным образцам), а при 100 ммоль/л – 21,8 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,001$  к контрольным образцам).

В пробах мононуклеарных лейкоцитов с путресцином показан аналогичный эффект влияния этого полиамина на продукцию иммуноглобулинов G. Коэффициент корреляции составил 0,98, при  $p<0,05$ . В концентрации 5, 25 и 50 ммоль/л путресцин не оказал статистически значимого эффекта на уровень иммуноглобулинов G ( $p>0,05$ ; **рис. 1, б/б**). Однако, при концентрации путресцина 75 ммоль/л уровень иммуноглобулинов составил 18,9 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,004$  к контрольным образцам),



Изменение продукции иммуноглобулинов класса G в культуре мононуклеарных лейкоцитов в присутствии путресцина (а) и кадаверина (б). По оси абсцисс – концентрации полиаминов в культуральной среде, ммоль/л; по оси ординат – концентрация IgG, МЕ на 1 мг белка. Changes in the immunoglobulins of the class G production in a culture of mononuclear leukocytes in the presence of putrescine (a) and cadaverine (b). Abscissus axis – polyamine concentrations in the culture medium, mmol/l; ordinate axis – IgG concentration, IU per 1 mg of protein.

а при 100 ммоль/л – 20,6 МЕ на 1 мг белка ( $p=0,003$  к контрольным образцам).

### Обсуждение

В ходе эволюции бактерии выработали различные стратегии адаптации к условиям макроорганизма, что позволяет им выживать в постоянно меняющейся среде. Так, например, активно включая в свой метаболизм белки тканей человека, бактерии постепенно нарабатывают полиамины, которые, как известно, образуются в результате разрушения белковых молекул [9, 10]. При значительном повышении концентрации путресцина и кадаверина выявлена стимуляция синтеза IgG, что указывает на локальную патофизиологическую роль бактериальных полиаминов в очаге воспаления, особенно при хроническом течение процесса. Можно предположить, что, запуская синтез антител, микроорганизмы способны вызвать избыточное образование этих молекул, а это в свою очередь приводит в конечном итоге к истощению пула IgG. Такая ситуация в очаге воспаления ингибирует дальнейший каскад иммунологических реакций и реализацию микробицидного потенциала лейкоцитов.

При длительной персистенции бактерий иммуноглобулины класса G, как правило, накапливаются, однако параллельно повышается концентрация полиаминов, которые, как можно предположить, ингибируют эффекторные функции этого класса иммуноглобулинов.

Таким образом, большое количество полиаминов способствует большей выработке иммуноглобулинов класса G, который отвечает за длительную гуморальную защиту от повторного поступления чужеродных антигенов в организм.

### Заключение

Выявлено что бактериальные метаболиты путресцин и кадаверин обладают стимулирующим влиянием на продукцию иммуноглобулинов класса G лимфоцитами.

#### Сведения об авторах:

**Морозов Илья Андреевич**, аспирант каф. микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: doc.morozov@hotmail.com;

**Годовалов Анатолий Петрович**, канд. мед. наук, доцент, доцент каф. микробиологии и вирусологии, вед. науч. сотр., ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России;

**Баяндина Софья Григорьевна**, студентка 6 курса, педиатрический факультет ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России.

### Литература

#### (п.п. 3–10 см. References)

1. Морозов И.А., Карпунина Т.И., Годовалов А.П. Кадаверин как регулятор активности про- и эукариотических клеток. *Аллергология и иммунология*. 2018; 19(3): 149–50.
2. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю., Морозов И.А. Полиамины как рецептор-независимый фактор агрессии условно-патогенных микроорганизмов. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2019; 3: 91–4. <https://doi.org/10.14427/jipai.2019.3.91>

### References

1. Morozov I.A., Karpunina T.I., Godovalov A.P. Cadaverine as a regulator of the activity of pro- and eukaryotic cells. *Allergologiya i Immunologiya*. 2018; 19(3): 149–50. (in Russian)
2. Godovalov A.P., Karpunina T.I., Nesterova L.Yu., Morozov I.A. Polyamines as receptor-independent factors of aggression of opportunistic microorganisms. *Immunopathologiya, allergologiya, infektologiya*. 2019; 3: 91–4. <https://doi.org/10.14427/jipai.2019.3.91> (in Russian)
3. Shah P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular microbiology*. 2008; 68(1): 4–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x>
4. Kurihara S. Polyamine metabolism and transport in gut microbes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2022; 86 (8): 957–66. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbac080>
5. Liu G., Zheng J., Wu X., Xu X., Jia G., Zhao H., et al. Putrescine enhances intestinal immune function and regulates intestinal bacteria in weaning piglets. *Food Function*. 2019; 10: 4134–42. <https://doi.org/10.1039/c9fo00842j>
6. Carriche G.M., Almeida L., Stüve P., Velasquez L., Dhillon-LaBrooy A., Roy U., et al. Regulating T-cell differentiation through the polyamine spermidine. *The journal of allergy and clinical Immunology*. 2021; 147(1): 335–48. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.037>
7. Puleston D.J., Baixauli F., Sanin D.E., Edwards-Hicks J., Villa M., Kabat A.M., et al. Polyamine metabolism is a central determinant of helper T cell lineage fidelity. *Cell*. 2021; 184: 4186–202. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.007>
8. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Medical sciences*. 2018; 6(22): 1–19. <https://doi.org/10.3390/medsci6010022>
9. Napodano C., Marino M., Stefanile A., Pocino K., Scatena R., Gulli F., et al. Immunological role of IgG subclasses. *Immunological investigations*. 2021; 50(4): 427–44. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1775643>
10. Cruz A.R., Bentlage A.E., Blonk R., de Haas, C.J.C., Aerts P.C., Scheepmaker L.M., et al. Toward understanding how Staphylococcal protein A inhibits IgG-mediated phagocytosis. *Journal of immunology*. 2022; 209(6): 1146–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200080>

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616.9:579.841.93

Саркисян Н.С.<sup>1</sup>, Куличенко А.Н.<sup>1</sup>, Калашникова М.В.<sup>1</sup>, Ковалевич Н.И.<sup>2</sup>**Анализ уровня цитокинов у больных острым бруцеллёзом в оценке системного воспаления**<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора,  
355035, Ставрополь, Россия, ул. Советская, д. 13-15;<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
355017, Ставрополь, Россия, ул. Мира, д. 310

**Введение.** Проблема бруцеллёза на современном этапе обуславливает необходимость изучения патофизиологических особенностей инфекции, в том числе оценки роли про- и противовоспалительных цитокинов в патогенезе заболевания.

**Цель исследования** – патофизиологическая оценка развития системного воспаления при остром бруцеллёзе на основании определения уровня цитокинов в сыворотке крови.

**Методика.** Объект исследования – больные с диагнозом «острый бруцеллёз», ( $n=22$ ), находившиеся на стационарном лечении в инфекционной больнице. Материалом для исследования служила сыворотка крови больных острым бруцеллёзом. Анализ уровня цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) проводили на мультиплексном анализаторе BIO-PLEX 200 с использованием набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex.

**Результаты.** Отмечено повышение уровня интерлейкинов: IL-1 $\beta$  –  $1,43\pm 0,55$  пг/мл, IL-5 –  $58,03\pm 6,27$  пг/мл, IL-7 –  $18,58\pm 6,75$  пг/мл, IL-10 –  $5,63\pm 0,97$  пг/мл, IL-12p70 –  $27,7\pm 4,26$  пг/мл ( $p\leq 0,05$ ) в острую фазу заболевания, а также увеличение концентрации гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF)  $11,7\pm 3,27$  пг/мл, относительно референтных данных ( $p\leq 0,05$ ). Результаты исследования свидетельствуют о повышении секреции медиаторов воспаления IL-1 $\beta$ , IL-12p70, способствующих активации нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов крови, впоследствии приводящих к усиленному синтезу G-CSF. Данные цитокины являются ключевыми в инициации клеточно-опосредованного иммунного ответа при бруцеллёзной инфекции. Противовоспалительный цитокин (IL-10), продуцируемый Т-хелперами 2 типа (Th2) стимулирует секрецию иммуноглобулина (IgE), являясь ключевым регулятором реакин-опосредованного иммунного ответа в патогенезе бруцеллёза. Увеличение продукции маркеров – IL-5, IL-7, связано с активацией адаптивного иммунного ответа при бруцеллёзе, направленной на защиту от внутриклеточного патогена.

**Заключение.** При бруцеллёзной инфекции наблюдается дисбаланс между про- и противовоспалительными звеньями в системе цитокинов. Полученные данные показали, что наиболее диагностически значимыми маркерами в патогенезе заболевания являются – ИЛ-1 $\beta$ , IL-12p70, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF).

**Ключевые слова:** бруцеллёз; воспаление; провоспалительные цитокины; противовоспалительные цитокины

**Для цитирования:** Саркисян Н.С., Куличенко А.Н., Калашникова М.В., Ковалевич Н.И. Анализ уровня цитокинов у больных острым бруцеллёзом в оценке системного воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 38–44.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.38-44

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, проведение исследований, сбор и описание материала, подготовка иллюстративного материала – Саркисян Н.С.; концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Куличенко А.Н.; подготовка иллюстративного материала, анализ научной литературы – Калашникова М.В.; проведение исследований – Ковалевич Н.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

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

**Финансирование.** Работа не имеет спонсорской поддержки.

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

Поступила 11.09.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

Sarkisyan N.S.<sup>1</sup>, Kulichenko A.N.<sup>1</sup>, Kalashnikova M.V.<sup>1</sup>, Kovalevich N.I.<sup>2</sup>

## Analysis of cytokine concentrations in patients with acute brucellosis in the assessment of systemic inflammation

<sup>1</sup>Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor,

13-15 Sovetskaya st., Stavropol, 355035, Russian Federation;

<sup>2</sup>Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of Russia,

310 Mira st., Stavropol, 355017, Russian Federation

**Introduction.** The problem of brucellosis at the present stage necessitates studying pathophysiological features of this infection, including the assessment of the role of pro- and anti-inflammatory cytokines in its pathogenesis.

**The aim** of the study was a pathophysiological assessment of the development of systemic inflammation in acute brucellosis based on cytokine concentrations in the blood serum.

**Methods.** The study object was patients with acute brucellosis ( $n=22$ ) admitted to the infectious diseases hospital. The study material was the blood serum from patients with acute brucellosis. Concentrations of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) were measured with a BIO-PLEX 200 multiplex analyzer using a Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex kit.

**Results.** Increased concentrations of interleukins (IL-1 $\beta$ , 1.43 $\pm$ 0.55 pg/ml; IL-5, 58.03 $\pm$ 6.27 pg/ml; IL-7, 18.58 $\pm$ 6.75 pg/ml; IL-10, 5.63 $\pm$ 0.97 pg/ml; IL-12p70, 27.7 $\pm$ 4.26 pg/ml ( $p\leq 0.05$ )) were noted in the acute phase of the disease, as well as an increase in the concentration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 11.7 $\pm$ 3.27 pg/ml, vs. reference values ( $p\leq 0.05$ ). The results of the study indicated an increased secretion of inflammatory mediators IL-1 $\beta$  and IL-12p70, that promote the activation of neutrophils, monocytes, and blood lymphocytes and the ensuing increase in G-CSF synthesis. These cytokines are crucial in initiating the cell-mediated immune response during brucellosis infection. The anti-inflammatory cytokine IL-10 produced by T-helper type 2 (Th2) cells stimulates the secretion of immunoglobulin IgE being a key regulator of the reagin-mediated immune response in the pathogenesis of brucellosis. The increased production of the IL-5 and IL-7 markers is associated with the activation of the adaptive immune response in brucellosis aimed at the protection against the intracellular pathogen.

**Conclusion.** Brucellosis infection is associated with an imbalance between pro- and anti-inflammatory components of the cytokine system. This study showed that the most diagnostically significant markers in the pathogenesis of the disease are IL-1 $\beta$ , IL-12p70, and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).

**Keywords:** brucellosis; inflammation; proinflammatory cytokines; anti-inflammatory cytokines

**For citation:** Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N., Kalashnikova M.V., Kovalevich N.I. Analysis of cytokine concentrations in patients with acute brucellosis in the assessment of systemic inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2024; 68(4): 38–44. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.38-44

**Author's contribution:** concept and design of the study, conducting research, collecting and describing material, preparing illustrative material – Sarkisyan N.S.; concept and design of the study, editing the article – Kulichenko A.N.; preparation of illustrative material, analysis of scientific literature – Kalashnikova M.V.; conducting research – Kovalevich N.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

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

### Information about the authors:

Sarkisyan N.S., <https://orcid.org/0000-0003-3512-5738>Kulichenko A.N., <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>Kalashnikova M.V., <https://orcid.org/0009-0003-2247-0425>Kovalevich N.I., <https://orcid.org/0000-0002-3695-125X>**Financing.** The work had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 11.09.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Бруцеллёз представляет собой общий генерализованный инфекционный процесс, характеризующийся бактериемией, незавершённым фагоцитозом, внутриклеточным паразитированием, персистенцией, разви-

тием локальной и системной воспалительной реакцией, сенсibilизацией организма бруцеллами.

Для элиминации бруцелл из организма хозяина необходимо формирование адаптивного клеточного им-

мунитета, опосредованного Т-хелперами 1 типа (Th1). Образование пула CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных к бруцеллам, в первую очередь, требует распознавания патогена системой врожденного иммунитета и дальнейшей эффективной презентации антигенов эффекторным клеткам. Доказано, что несостоятельность врожденных иммунных механизмов противодействия бруцеллам сопровождается неполноценной Th1-иммунной реакцией и Т-клеточной анергией, что является одной из основных причин хронизации инфекции [1, 2].

Значительную роль в формировании иммунного ответа играют цитокины, им отводится ключевое значение в защите от бруцеллезной инфекции за счет участия как во врожденных, так и адаптивных иммунных реакциях иммунитета, сопровождающийся продукцией про- и противовоспалительных цитокинов. Бруцеллезная инфекция нарушает функцию Th1-клеток (CD8) и Th2-клеток (CD4), приводя к изменению экспрессии интерлейкинов. Прогрессирование инфекции в основном связано с цитокинами, синтезируемыми клетками Th2- типа: ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-10 [3]. Продукция провоспалительных цитокинов играет основополагающую роль для сохранения *Brucella spp.* в тканях хозяина. Типичный тканевой ответ на бруцеллезную инфекцию – гранулематозное воспаление – защитная реакция макроорганизма, направленная на локализацию патогена ввиду несостоятельности фагоцитарных механизмов в отношении бруцелл [4]

Изучение инфекционного процесса посредством анализа цитокинового профиля позволит прогнозировать течение инфекции, исход заболевания и оценить эффективность фармакотерапии. Учет динамики показателей про- и противовоспалительных профилей цитокинов у больных острым бруцеллезом, даст возможность охарактеризовать реакцию иммунной системы при данной патологии.

**Цель исследования** – патофизиологическая оценка развития системного воспаления при остром бруцеллезе на основании определения уровня цитокинов в сыворотке крови.

### Методика

Исследован клинический материал (сыворотка крови) от 22 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом «Острый бруцеллез», поступивших в 2022 г. в инфекционное отделение, специализированное по диагностике, лечению и профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя и ГБУ Республики Дагестан «Республиканский центр инфекционных болезней, профилактики и борьбы со СПИДом им. С.М. Магоме-

дова». Образцы крови были получены при поступлении больного в стационар. Срок заболевания больных бруцеллезной инфекцией составил от 2 до 6 недель.

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

Отбор и рандомизацию больных бруцеллезом проводили в соответствии с индивидуальными регистрационными картами больных (истории болезни) с учетом классификации клинических форм бруцеллеза по Г.П. Рудневу (1955). Все больные острым бруцеллезом имели среднюю степень тяжести течения болезни, в фазе компенсации. По характеру очаговых поражений преобладала комбинированная форма (локомоторная и висцеральная) бруцеллеза.

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

Преаналитический этап лабораторных исследований проводили в соответствии с существующими приказами и рекомендациями Министерства здравоохранения РФ по контролю качества лабораторных исследований. Образцы венозной крови забирали в пробирку с активатором свертывания. Обеззараживание исследуемого материала (крови) осуществляли в соответствии с СанПиНом 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследование уровня иммунологических маркеров проводили на анализаторе BIO-PLEX 200 с использованием мультиплексной панели Bio-Plex Pro™ Human Th17 Cytokine. Анализ уровня цитокинов проводился в соответствии с инструкцией к тест-системе. Необходимый объем исследуемой сыворотки, составил 50 мкл. Анализ биоматериала проводился в трех повторах, расчёт концентрации интерлейкинов осуществлялся посредством программного обеспечения производителя (Bio-Rad, США).

Для доказательства нормальности распределения данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Проведен расчёт доверительного интервала для среднего значения по формуле:  $\Delta = \frac{\delta}{\sqrt{n}} z_{\alpha}$ , где  $\delta$  – стандартное отклонение;  $n$  – объем выборки;  $z_{\alpha}$  – кван-

ть, определяемый по таблице нормального распределения [5].

### Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал увеличение уровня следующих интерлейкинов: IL-1 $\beta$  – 1,43 $\pm$ 0,55 пг/мл, IL-5 составил 58,03 $\pm$ 6,27 пг/мл, IL-7 – 18,58 $\pm$ 6,75 пг/мл, IL-10 – 5,63 $\pm$ 0,97 пг/мл, IL-12p70 – 27,7 $\pm$ 4,26 пг/мл, а также G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) 11,7 $\pm$ 3,27 пг/мл, относительно референтных данных ( $p < 0,05$ ). Статистическая значимость различий по остальным цитокинам ( $p \geq 0,05$ ). Данные представлены в **таблице**. Графически на **рисунке** по каждому цитокину отражен диапазон концентрации (min/max), а также среднее значение концентрации.

В ходе проведенного исследования установлено, что у 13,6 % обследуемых отмечалось повышение концентрации IL-1 $\beta$  – 1,43 пг/мл (95% ДИ: 1,21 $\div$ 1,65) это связано с тем, что интерлейкин-1 $\beta$  участвует в первич-

ной стадии иммунного ответа: активирует лимфоциты (Т-хелперы) и способствует трансформации В-лимфоцитов в плазматические клетки, которые, в свою очередь, участвуют в образовании антител [6]. Интерлейкин-1 $\beta$  играет ключевую роль в развитии и регуляции неспецифической защиты и специфического иммунитета, одним из первых включается в ответную реакцию организма при действии патогенных микроорганизмов [7]. Основной биологической функцией провоспалительного IL-1 $\beta$  является, ограничение распространения патогенного агента, его элиминация, удаление из организма. Однако при определенных условиях (интенсивная, продолжающаяся антигенная стимуляция, дефект любого звена иммунной системы, длительная персистенция возбудителя) развивается прогрессирующий патологический процесс, при котором цитокины из фактора защиты могут стать фактором «агрессии», негативно сказывающимся на течении заболевания [7]. Такие изменения можно считать закономерными при бруцеллезной инфекции, учитывая длитель-

### Значения концентрации цитокинов у больных острым бруцеллезом в сравнении с референтными данными

#### Cytokine concentration values in patients with acute brucellosis in comparison with reference data

Исследуемый показатель	*Нормальная концентрация в диапазоне, пг/мл	Наблюдаемая концентрация, пг/мл	Доверительный интервал, (ДИ)
IL-1 $\beta$	<0,70	0,05-5,04	1,43 (1,21 $\div$ 1,65)**
IL-2	2,0-90,0	0,11-35,84	11,36 (10,09 $\div$ 12,63)
IL-4	0,06-3,0	0,74-7,65	2,06 (1,73 $\div$ 2,19)
IL-5	1,0-7,0	9,44-93,57	58,03 (55,4 $\div$ 60,25)**
IL-6	0,5-9,0	0,59-13,61	4,01 (3,71 $\div$ 4,31)
IL-7	0,60-13,0	3,77-35,18	18,58 (15,70 $\div$ 21,40)**
IL-8	0,40-116,0	2,39-72,2	24,81 (21,24 $\div$ 28,38)
IL-10	0,40-2,0	2,02-23,87	5,63 (5,23 $\div$ 6,03)**
IL-12(p70)	3,0-6,0	7,23-79,74	27,79 (26,0 $\div$ 29,57)**
IL-13	0,8-9,0	0,07-21,69	2,51 (2,09 $\div$ 2,93)
IL-17A	2,0-31,0	0,73-24,1	6,37 (5,12 $\div$ 7,62)
G-CSF	< 1,5	0,26-51,47	11,78 (10,42 $\div$ 13,14)**
GM-CSF	3,0-122	6,43-34,3	14,95 (14,41 $\div$ 15,49)
IFN- $\gamma$	7,0-124,0	0,09-11,94	2,84 (2,06 $\div$ 3,62)
MCP-1	2,0-48,0	1,46-50,94	9,76 (8,52 $\div$ 11,0)
MIP-1 $\beta$	5,0-47,0	1,19-56,82	18,97 (17,42 $\div$ 20,42)
TNF- $\alpha$	6,0-98,0	2,02-118,1	22,57 (19,93 $\div$ 25,21)

**Примечание.** Нормальные физиологические уровни цитокинов человека с использованием цитокиновых анализов Bio-Plex Pro™. Бюллетень 6029, ред. А, США/EG. \*\* –  $p < 0,05$  уровень значимости доверительного интервала цитокинов.

**Note.** Normal physiological levels of human cytokines using Bio-Plex Pro™. Cytokine Assays Bulletin 6029 Rev A US/EG.

\*\* –  $p < 0,05$  significance level of the cytokine confidence interval.

ную внутриклеточную персистенцию патогенного микроорганизма.

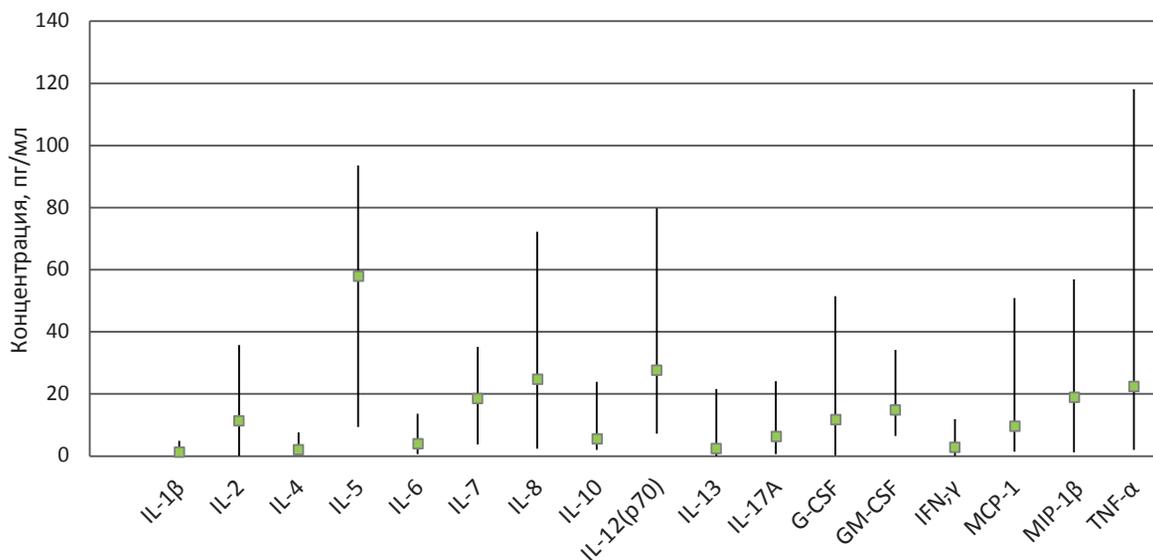
В обследуемой группе больных острым бруцеллёзом у 31,6 %, показано увеличение продукции IL-5 – 58,03 пг/мл (95% ДИ: 55,4÷60,25), что сопоставимо с данными научных исследований [8] в которых предполагается, что стимуляция IL-5 иммунных клеток представляет собой особый механизм защиты при системном воспалении. IL-5 цитокин, продуцирующийся Th2 клетками, индуцирующий пролиферацию, дифференцировку эозинофилов и активацию В-клеток [9], выполняющий ключевые патофизиологические функции посредством специфического рецептора (IL-5R), который экспрессируют преимущественно эозинофилы [10]. IL-5 снижает концентрации IL-6 и TNF-α, подавляя системную воспалительную реакцию, вызванную сепсисом [11]. Касательно бруцеллезной инфекции в острую стадию в период эндотоксемии, бактериемии можно сделать предположение, что повышенный синтез IL-5 – компенсаторно-защитный механизм, направленный на снижение воспалительного ответа.

Повышение синтеза IL-7 отмечалось у 18,1 % обследуемых больных с диагнозом острый бруцеллёз; в среднем концентрация данного интерлейкина составила 18,58 пг/мл (95% ДИ: 15,70÷21,40). Согласно данным литературы роль IL-7 в иммунном ответе при инфекциях, вызванных внутриклеточными бактерия-

ми, может быть опосредована механизмом усиленной секреции провоспалительных цитокинов – IL-1β, IL-6 и TNF-α [12]. Наши исследования продемонстрировали увеличение уровня IL-1β, значения концентраций IL-6 и TNF-α были сопоставимы с референсными данными. IL-7 – цитокин, продуцирующийся клетками стромы костного мозга, селезёнки, тимуса, кератиноцитами, дендритными и эпителиальными клетками; способствует созреванию и пролиферации предшественников В и Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров [9, 13].

Кроме того, результат исследования J.A. Van Roon и соавт. показал, что IL-7 может вызывать разрушение суставов посредством иммунной активации; под действием IL-1 и IL-6 увеличивается продукция IL-7, который индуцирует выработку протеаз хондроцитами, а именно синтез металлопротеиназы – MMP-13 приводит к усиленному высвобождению протеогликанов из хрящевого матрикса и деградации хрящевой ткани, способствуя разрушению суставов при остеоартрите и других заболеваниях опорно-двигательного аппарата [14].

Данный патофизиологический механизм, возможно, может быть ключевым в поражении костно-суставной системы у больных бруцеллёзом, ввиду особенностей патогенеза обусловленной длительной персистенцией возбудителя. Анализ основных клинических проявлений у больных острой формой бру-



■ Среднее значение концентрации цитокинов, пг/мл (n=22)

Значения концентрации цитокинов у больных острым бруцеллёзом.

Values of cytokine concentration in patients with acute brucellosis.

целлѐза по данным выписок из историй болезни показал наличие лихорадки различной степени выраженности, артралгии и гепатоспленомегалии.

Усиленная секреция IL-10 – 5,63 пг/мл (95% ДИ: 5,23÷6,03), IL-12p70 – 27,79 пг/мл (95% ДИ: 26,0÷29,57) отмечалась у 26,3% обследуемых, важной особенностью IL-10 в иммуногенезе бруцеллѐза является его способность стимулировать синтез IgE, участвовать в формировании реакин-опосредованной специфической сенсибилизации организма в начальный период заболевания [4]. В поздних стадиях бруцеллѐзной инфекции увеличение продукции IL-10 способствует супрессии защитного Th1 ответа, что позволяет бруцеллам ускользать от механизмов врожденного иммунного ответа, и внутриклеточно персистировать в клетках макрофагально-моноцитарной системы, впоследствии приводя к хроническому течению инфекции. IL-10 относится к противовоспалительному иммунорегуляторному цитокину, который может подавлять иммунный ответ на *B. abortus*, влияя как на эффекторную функцию макрофагов, так и на выработку IFN- $\gamma$  [15]. Концентрация другого противовоспалительного цитокина – IL-4 показала статически не значимый результат в настоящем исследовании. Сведения, касающиеся роли интерлейкина-4 при бруцеллѐзе у людей недостаточны, но имеются данные экспериментального моделирования бруцеллѐзной инфекции на биомоделях, где показано, что уровень интерлейкина-4 оставался в пределах референсных значений, что связано с преобладанием Th-1 иммунного ответа [16]. Необходимо дальнейшее исследование для более детального понимания участия IL-4 в иммунопатогенезе бруцеллѐза у людей.

IL-12 ключевой цитокин, усиливающий клеточно-опосредованный иммунный ответ, стимулирующий Th1 типа, продукцию IFN- $\gamma$  и пролиферацию Т-лимфоцитов, натуральных киллеров [9]. Усиление иммунного ответа по Th1-типу имеет важное значение для защиты хозяина от внутриклеточных патогенов [17].

Полученные данные показали повышение G-CSF у больных острым бруцеллѐзом в 100 % случаев, среднее значение концентрации данного цитокина составило – 11,78 пг/мл (95% ДИ: 10,42÷13,14). При системных бактериальных инфекциях отмечается усиленная продукция и высвобождение нейтрофилов из костного мозга в кровотоки [18]. G-CSF – гемопоэтический цитокин, продуцирующийся моноцитами/макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками [19], стимулирующий гранулоцитопоез, увеличивающий число нейтрофилов в периферической крови, усиливающий их фагоцитарную и хемотаксическую активность [20]. Эндотелиальные клетки распознают циркулирующие

в системном кровотоке структурные компоненты бактерий (липополисахарид – ЛПС), посредством рецептора TLR4, индуцируя повышенную продукцию G-CSF [13]. Можно предположить, что в острую фазу при эндогенной интоксикации ЛПС бруцелл инициируют запуск клеток гранулоцитопоеза, посредством стимуляции эндотелиоцитов, приводя к усиленной секреции G-CSF.

### Заключение

Системный характер бруцеллѐзной инфекции, обусловлен длительной персистенцией бруцелл в инфицированных тканях, приводящей к продолжительной воспалительной альтерации. Липополисахаридные комплексы бруцелл инициируют развитие воспалительной реакции, в результате происходит запуск и активация клеточных функций, связанных с синтезом про- и противовоспалительных цитокинов. Результаты исследования свидетельствуют о повышении секреции медиаторов воспаления IL-1 $\beta$ , IL-12p70, способствующих активации нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов крови, впоследствии приводящих к усиленному синтезу G-CSF. Данные цитокины являются ключевыми в инициации клеточно-опосредованного иммунного ответа при бруцеллѐзной инфекции. Противовоспалительный цитокин (IL-10), продуцируемый Т-хелперами 2 типа (Th2) стимулирует секрецию иммуноглобулина (IgE), являясь ключевым регулятором реакин-опосредованного иммунного ответа в патогенезе бруцеллѐза. Увеличение продукции маркеров – IL-5, IL-7, связано с активацией адаптивного иммунного ответа при бруцеллѐзе, направленной на защиту от внутриклеточного патогена. При бруцеллѐзе наблюдаются дефекты как в клеточном, так и гуморальном звеньях иммунитета. Ключевая роль принадлежит клеточному иммунитету и дисбалансу Th1 типа, про- и противовоспалительных цитокинов. При этом данные, касающиеся состояния разных классов цитокинов при бруцеллѐзе, малочисленны и противоречивы. Исследование уровня цитокинов при бруцеллѐзе позволяет проанализировать работу иммунной системы, оценить степень иммунологических сдвигов и дисбаланса в продукции цитокинов. Защитный иммунитет против *B. abortus* связан с синтезом провоспалительных цитокинов в ответе по Th1-типу, в связи с этим бруцеллы стремятся избегать защитного иммунного ответа этого типа и стимулируют продукцию противовоспалительного цитокина IL-10. Дальнейшее изучение цитокинового профиля в развитии и поддержании системного воспаления при остром бруцеллѐзе позволит провести оценку участия про- и противовоспалительных цитокинов в иммунопатогенезе бруцеллѐзной инфекции.

## Литература

(п.п. 1-4; 8; 10-14; 17-20 см. References)

5. Урбах В.Ю. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. Акад. мед. наук СССР. М.: Медицина; 1975.
6. Саркисян Н.С., Куличенко А.Н., Ковалевич Н.И., Санникова И.В., Махиня О.В. Комплексная оценка цитокинового профиля, протеинограмм и белков острой фазы воспаления у пациентов с острым бруцеллезом. *Иммунология*. 2021; 42(5): 511–7. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-511-51724>
7. Нагоева М.Х., Маржохова М.Ю., Афашагова М.М. Изучение роли цитокинового профиля при бактериальных ангинах. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; (6). URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=23625> (дата обращения: 05.09.2024).
9. Сташкевич Д.С., Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова Д.С. *Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения: учебное пособие*. Челябинский государственный университет. Цицеро, 2016.
15. Бруцеллёз. *Современное состояние проблемы*. Под ред. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н. Ставрополь: ООО «Губерния», 2019.
16. Юнси Г.А., Василенко С.А., Фельдман Е.И., Хайретдинова З.З. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор: реалии и перспективы использования в клинической медицине. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2017; 7(3): 100-5.
8. Linch S.N., Danielson E.T., Kelly A.M., Tamakawa R.A., Lee J.J., Gold J.A. Interleukin 5 is protective during sepsis in an eosinophil-independent manner. *Amer J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(3): 246-54. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0134OC>
9. Stashkevich D.S., Filippova Yu.Yu., Burmistrova D.S. *Current issues in immunology: cytokine system, biological significance, genetic polymorphism, determination methods: Ucheb. Posobie. [Aktual'nye voprosy immunologii: sistema tsitokinov, biologicheskoe znachenie, geneticheskii polimorfizm, metody opredeleniya: uchebnoe posobie]*. Chelyabinskii gosudarstvennyi universitet. Cicero, 2016. (in Russian)
10. Varricchi G., Bagnasco D., Borriello F., Heffler E., Canonica G.W. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2016; 16(2): 186-200. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000251>
11. Wei B., Chen Y., Zhou W., Li X., Shi L., Liao S. Interleukin IL-5 alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating the immune response in rats. *Bioengineered*. 2021; 12(1): 2132-9. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1930746>
12. Maeurer M.J., Trinder P., Hommel G., Walter W., Freitag K., Atkins D., et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*. 2000; 68(5): 2962-70. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2962-2970.2000>
13. Huang J., Long Z., Jia R., Wang M., Zhu D., Liu M., et al. The broad immunomodulatory effects of IL-7 and its application in vaccines. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 680442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680442> eCollection 2021
14. Van Roon J.A., Lafeber F.P. Role of interleukin-7 in degenerative and inflammatory joint diseases. *Arthritis research & therapy*. 2008; 10(2): 107. <https://doi.org/10.1186/ar2395>
15. *Brucellosis. Current state of the problem. [Brucellyoz. Sovremennoe sostoyanie problem]*. Ed. G.G. Onishchenko, A.N. Kulichenko. Stavropol': ООО «Guberniya», 2019. (in Russian)
16. Yunsi G.A., Vasilenko S.A., Feldman E.I., Khayretdinova Z.Z. Granulocyte colony-stimulating factor: realities and prospects for use in clinical medicine. *Krymskii zhurnal eksperimental'noi i klinicheskoi meditsiny*. 2017; 7(3): 100-5. (in Russian)
17. Mora-Cartín R., Gutiérrez-Jiménez C., Alfaro-Alarcón A., Chaves-Olarte E., Chacón-Díaz C., Barquero-Calvo E., et al. Neutrophils dampen adaptive immunity in brucellosis. *Infect Immun*. 2019; 87(5): e00118-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00118-19>
18. Hamza T., Barnett J.B., Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International journal of molecular sciences*. 2010; 11(3): 789-806. <https://doi.org/10.3390/ijms11030789>
19. Boettcher S., Gerosa R.C., Radpour R., Bauer J., Ampenberger F., Heikenwalder M., et al. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood*. 2014; 124(9): 1393-403. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-570762>
20. Jing W., Guo X., Qin F., Li Y., Wang G., Bi Y., et al. G-CSF shifts erythropoiesis from bone marrow into spleen in the setting of systemic inflammation. *Life science alliance*. 2020. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000737>

## References

1. Fernandes D.M., Baldwin C.L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. *Infection and Immunity*. 1995; 63(3): 1130-3. <https://doi.org/10.1128/iai.63.3.1130-1133.1995>
2. Forestier C., Deleuil F., Lapaque N., Moreno E., Gorvel J.P. Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *Immunology*. 2000; 165(9): 5202-10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5202>
3. Tang Y., Ma Ch., Sun Hu., Yang S., Yu F., Li X., et al. Serum Levels of Seven General Cytokines in Acute Brucellosis Before and After Treatment. *Infect Drug Resist*. 2021; 14: 5501-10. <https://doi.org/10.2147/IDR.S341331>
4. De Jong M.F., Tsolis R.M. Brucellosis and type IV secretion. *J. Future Microbiology*. 2012; 7(1): 47-58. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.136>
5. Urbakh V.Yu. *Statistical analysis in biological and medical research. [Statisticheskii analiz v biologicheskikh i meditsinskikh issledovaniyakh]*. Akad. med. nauk SSSR. Moscow: Meditsina, 1975. (in Russian)
6. Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N., Kovalevich N.I., Sannikova I.V., Makhinya O.V. Comprehensive assessment of the cytokine profile, proteinograms and proteins of the acute phase of inflammation in patients with acute brucellosis. *Immunologiya*. 2021; 42(5): 511–7. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-511-51724> (in Russian)
7. Nagoeva M.Kh., Marzhokhova M.Yu., Afashagova M.M. Study of the role of cytokine profile in bacterial tonsillitis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015. (6). URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=23625> (дата обращения: 05.09.2024). (in Russian)

## Сведения об авторах:

**Саркисян Нушик Сааковна**, канд. мед. наук, зав. отделом консультационно-профилактической работы, врач клин. лаб. диагностики, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора;

**Куличенко Александр Николаевич**, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора;

**Калашикова Мария Владимировна**, врач клинической лабораторной диагностики научно-профилактической клинико-диагностической работы, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора;

**Ковалевич Надежда Игоревна**, канд. мед. наук, зав. клинико-диагностической лаб., ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092

**Керимов Т.З.<sup>1,2</sup>, Борзенко С.А.<sup>1,2</sup>, Гаврилова Н.А.<sup>1</sup>, Островский Д.С.<sup>2</sup>,  
Хубецова М.Х.<sup>2</sup>, Соболев В.П.<sup>3</sup>****Стимуляция естественных механизмов противовирусной защиты  
в донорской роговице человека на этапе консервации**<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России,

127006, Москва, Россия, ул. Долгоруковская, д.4;

<sup>2</sup>ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России,

127486, Москва, Россия, Бескудниковский бульвар, д. 59 А;

<sup>3</sup>ФГАОУВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет),

119048, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2

**Введение.** В настоящем исследовании проводится оценка способности ткани роговицы к активации механизмов врожденного иммунитета для вирусной деконтаминации трансплантата роговицы. На сегодня известно, что вирусная инвазия приводит к активации системы врожденного иммунитета. Однако, данные о способности ткани роговицы к продукции собственных интерферонов ограничены. В связи с этим была сформулирована цель данного исследования. **Цель:** изучить способность ткани донорской роговицы человека к продукции собственных интерферонов 1 типа (ИФН-α и ИФН-β) в эксперименте *in vitro* на клеточных культурах кератоцитов и фибробластов.

**Методика.** Для выполнения данной цели использовались трупные донорские роговицы человека, а также выделенные и культивированные клетки роговицы – кератоциты и фибробласты. В состав культуральной среды опытной группы для активации механизма врожденного иммунитета добавляли индуктор интерферона. Контролем выступали клетки, культивированные в полной ростовой среде. По окончании эксперимента проводили иммуногистохимическое исследование для определения фенотипической трансформации, а также иммуноферментный анализ для обнаружения эндогенных ИФН-α и ИФН-β.

**Результаты.** В результате проведенной работы установлено, что воздействие ростовой среды с индуктором интерферона в концентрации 1 мг/100 мл на клеточные культуры кератоцитов и фибробластов привело к выработке интерферонов 1 типа (ИФН-α и ИФН-β), при достоверно большем количестве выделенного интерферона в клеточной культуре фибробластов по сравнению с клеточной культурой кератоцитов ( $p < 0,05$ ).

**Выводы.** Добавление индуктора интерферона в состав ростовой среды на 24 ч приводит к активации механизма врожденного иммунитета в клетках и ткани роговицы, в большей степени – в клеточной культуре фибробластов, при этом не вызывает изменение фенотипа.

**Ключевые слова:** роговица; иммунитет; деконтаминация; вирус; интерферон

**Для цитирования:** Керимов Т.З., Борзенко С.А., Гаврилова Н.А., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Соболев В.П. Стимуляция естественных механизмов противовирусной защиты в донорской роговице человека на этапе консервации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 45–51.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.45-51

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Борзенко С.А., Гаврилова Н.А., Соболев В.П., Керимов Т.З.; проведение экспериментальных исследований – Керимов Т.З., Островский Д.С.; статистическая обработка результатов исследования – Керимов Т.З., Хубецова М.Х.; написание текста, редактирование статьи – Керимов Т.З., Борзенко С.А.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Керимов Тимур Захирович, e-mail: TimKerimov2014@yandex.ru

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

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

Поступила 10.10.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

Kerimov T.Z.<sup>1,2</sup>, Borzenok S.A.<sup>1,2</sup>, Gavrilova N.A.<sup>1</sup>, Ostrovsky D.S.<sup>2</sup>, Khubetsova M.Kh.<sup>2</sup>, Sobolev V.P.<sup>3</sup>

## Stimulation of innate immune mechanisms in human donor corneas

<sup>1</sup>Russian University of Medicine,

4 Dolgorukovskaya St., Moscow, 127006, Russian Federation;

<sup>2</sup>Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution,

59A Beskudnikovskiy Blvd., Moscow, 127486, Russian Federation;

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University,

8 Trubetskaya St., Bldg. 2, Moscow, 119048, Russian Federation

**Introduction.** This study evaluated the ability of corneal tissue to activate the innate immune system for viral decontamination of a corneal graft. It is well known that viral invasion activates the innate immune system. However, there is a shortage of publications on the ability of corneal tissue to produce its own interferons. Thus, the **aim** of this study was to evaluate the ability of cadaveric human donor corneal tissue to produce its own type 1 interferons (IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ) in an *in vitro* experiment on cell cultures of corneal keratocytes and corneal fibroblasts.

**Methods.** To achieve this aim, we used cadaveric human donor corneas and isolated and cultured corneal keratocytes and corneal fibroblasts. An interferon inducer was added to the culture medium of the experimental group to activate the innate immune system. Cells cultured in a complete culture medium served as a control. At the end of the experiment, an immunohistochemical study was performed to determine the phenotypic transformation and an enzyme immunoassay to detect endogenous IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ .

**Results.** The culture medium with 1 mg/100 ml of the interferon inducer added to the cultured keratocytes and fibroblasts induced the production of type 1 interferons (IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ), with a significantly greater amount of interferon released in the fibroblast cell culture compared to the keratocyte cell culture ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** The interferon inducer added to the growth medium for 24 hours activated the innate immunity mechanism in corneal cells and tissue, significantly more in the fibroblast cell culture, without causing any change in the cell phenotype.

**Keywords:** cornea; immunity; decontamination; virus; interferon

**For citation:** Kerimov T.Z., Borzenok S.A., Gavrilova N.A., Ostrovsky D.S., Khubetsova M.Kh., Sobolev V.P. Stimulation of innate immune mechanisms in human donor corneas. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 45–51. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.45-51

**Authors' contribution:** study concept and design – Borzenok S.A., Gavrilova N.A., Sobolev V.P., Kerimov T.Z.; experimental studies –

Kerimov T.Z., Ostrovsky D.S.; statistical processing of study results – Kerimov T.Z., Khubetsova M.Kh.; writing the text, editing the text –

Kerimov T.Z., Borzenok S.A.; approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** **Timur Z. Kerimov**, PhD, research scientist, Laboratory of Transplantology and Cell Biology, Center for Fundamental and Applied Medical and Biological Problems, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, e-mail: TimKerimov2014@yandex.ru

### Information about the authors:

Kerimov T.Z., <https://orcid.org/0000-0001-8967-6370>Borzenok S.A., <http://orcid.org/0000-0001-9160-6240>Gavrilova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-0368-296X>Ostrovsky D.S., <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>Khubetsova M.Kh., <https://orcid.org/0000-0002-6378-8750>Sobolev V.P. <https://orcid.org/0000-0002-7372-3299>

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

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

Received 10.10.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Среди 8 типов герпесвирусов, характерных для человека, особого внимания заслуживает вирус простого герпеса 1 типа, поскольку он наиболее часто обнаруживается в клетках и ткани роговицы. Актуальные данные Всемирной Организацией Здравоохранения свидетельствуют о том, что 67% населения планеты в возрасте до 50 лет инфицированы вирусом простого

герпеса 1 типа [1]. Вирусная этиология герпетических поражений роговицы впервые была описана немецким офтальмологом Вильгельмом Грютером в 1912 г. [2]. На сегодня вирусы группы герпеса остаются ведущим фактором инфекционной природы, поражающим роговицу человека. Так, по оценкам отечественных исследователей, герпесвирусам отводится роль

ведущей причины роговичной слепоты. Подсчитано, что 60% роговичной слепоты является следствием герпетических кератитов, а также, что 66% всей патологии роговицы ассоциировано с герпесвирусами [3, 4]. Известно, что после инвазии в клетку вирус простого герпеса начинает синтезировать собственные копии, в связи с чем происходит нарушение протекания внутриклеточных обменных процессов, в результате чего клетка погибает, а множество копий вируса выходит в межклеточное пространство для инвазии в соседние клетки. Однако клетка имеет специальные защитные системы, которые эволюционно развивались для локализации подобных неблагоприятных сценариев. Так, наиболее древней из подобных защитных систем является система врожденного иммунитета, одним из основных звеньев которой являются интерфероны — группа белков с противовирусными свойствами. Интерфероны были открыты учеными Алик Айзекс и Жан Линдемманн в 1957 г. [5]. В предыдущих работах нами описано современное представление о патофизиологических основах иммунологической деконтаминации вируса простого герпеса 1 типа из роговицы [6]. Так, на сегодня известно, что распознавание и инвазия вируса простого герпеса 1 типа определяются клеткой через Toll-подобные рецепторы (TLR-рецепторы), которые относятся к семейству паттерн-распознающих рецепторов (PRR) [7-9]. Взаимодействуя с вирусом, TLR-рецепторы передают сигнал на активацию многих семейств белков, в том числе, на белки, индуцирующие образование интерферона (ИФН) бета (TRIF). Цепочка запущенных биохимических превращений приводит к активации двух отдельных каскадов реакций, один из которых приводит к выработке ИФН 1 типа, оставшийся — к синтезу провоспалительных цитокинов. Мощный противовирусный ответ врожденного иммунитета приводит к ограничению распространения вируса простого герпеса 1 типа [10].

В связи с вышеизложенным нами была определена цель настоящего исследования. **Цель исследования** — изучение способности ткани донорской роговицы человека к продукции собственных интерферонов 1 типа (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\beta$ ) в эксперименте *in vitro* на клеточных культурах кератоцитов и фибробластов.

### Методика

В экспериментальном исследовании использовались трупные донорские роговицы человека, полученные из Глазного тканевого банка ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в количестве 15 штук от 15 доноров-трупов. Согласно классификации транспланта-

бельности, предложенной С.А. Борзенком [11, 12], все роговицы соответствовали оценке 3А — трансплантатбельные роговицы, выделенные из глаз с интраокулярными линзами, что означает недостаточное количество клеток заднего эпителия — слоя роговицы, поддерживающего оптимальную гидратацию и гомеостаз трансплантата роговицы. При помощи роговичного микрокератома (Mogia Inc., Франция) из каждой роговицы были выделены 2 стромальных диска: один диск использовался для получения кератоцитов, оставшийся — для получения фибробластов. Затем стромальные диски разделяли на 2 части: одна часть использовалась для изучения влияния индуктора интерферона (мегломина акридонатацетата), оставшаяся равная часть использовалась в качестве контроля.

Для получения клеточных культур использовали стандартный алгоритм, включающий этапы начальной ферментативной обработки, измельчения, заключительной ферментативной обработки и центрифугирования получившейся клеточной взвеси. Работа с клетками и тканями проводилась в ламинарном боксе MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Спустя 7 сут культивирования и достижения культурой кератоцитов конfluэнтности 70-80% из чашек Петри 35 мм забирали ростовую среду, после чего клеточные культуры разделяли на опытную и контрольную группы: в опытную группу вносили 3 мл ростовой среды с индуктором интерферона (Циклоферон) в концентрации 1 мг/100 мл; в контрольную группу — 3 мл ростовой среды (отрицательный контроль). Выбор Циклоферона обусловлен известной противогерпетической активностью данного препарата; концентрация Циклоферона подбиралась в ходе пилотных исследований на основании цитотоксичности различных концентраций для клеток роговицы. Затем проводили культивирование в стандартных условиях (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) в инкубаторе NU-5510 (NuAire, США) в течение 24 часов, после чего образцы сред из каждой чашки Петри собирали в стерильные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл для проведения иммуноферментного анализа на содержание в них интерферонов.

В ходе получения фибробластов, по достижении 80% конfluэнтности (на 7-е сут), клетки пассивировали, после чего культивировали еще 7 сут в стандартных условиях (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) до достижения конfluэнтности 90-100%, после чего забирали ростовую среду и разделяли на группы: в опытную группу вносили 3 мл ростовой среды с Циклоферон в концентрации 1 мг/100 мл; в контрольную группу — 3 мл ростовой среды (отрицательный контроль). Клеточное культивирование проводили в стандартных условиях

(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) в течение 24 часов. Образцы сред из каждой чашки Петри собирали по окончании культивирования в стерильные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл для проведения иммуноферментного анализа на содержание интерферонов.

Иммуноферментный анализ образцов сред на содержание в них эндогенных ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\beta$  проводился по стандартной методике с применением коммерческих наборов ELISA Kit IFNa, IFNb по инструкции фирмы-производителя (Cloud-Clone Corp., США). Анализ оптической плотности проводился при помощи спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., США), при длине волны  $450 \pm 10$  нм.

Иммуногистохимическое исследование полученных клеточных культур для верификации фенотипа проводили по стандартной методике, которая включала фиксацию полученных клеток, их пермеабиллизацию, окрашивание образцов первичными антителами, окрашивание вторично-мечеными антителами, контрастирование клеточных ядер, после чего получившиеся препараты помещали под покровное стекло и оценивали на конфокальном лазерном сканирующем биологическом микроскопе (FLUOVIEW FV10i, OLYMPUS Corporation, Япония). Окраска проводилась на характерные маркеры данных клеточных культур:  $\alpha$ -гладкомышечный актин, кератокан, виментин. Анализ полученных изображений проводился при помощи программного обеспечения «CellProfiler» (Broad Institute Inc., США).

Статистический анализ полученных данных выполнялся с применением методов описательной статистики при помощи стандартного программного обеспечения с функциями статистической обработки данных (Microsoft Excel). Результаты статистической обработки данных в рукописи представлены в формате  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее значение;  $\sigma$  – стандартное отклонение. Достоверность различий между группами оценивалась с применением  $t$ -критерия Стьюдента. Отличия между группами считались статистически значимыми при значениях  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

По данным иммуногистохимического исследования полученных клеточных культур была показана сохранность нативного фенотипа кератоцитов: отмечена экспрессия кератокана, являющегося характерным маркером кератоцитов, при отсутствии, либо слабой экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина и виментина. При этом культура фибробластов экспрессировала  $\alpha$ -гладкомышечный актин и виментин, являющиеся характерными маркерами фибробластов, при

отсутствии, либо слабой экспрессии кератокана. Контролем окраски выступало наличие свечения по окончании окраски. При анализе полученных изображений в программном обеспечении «CellProfiler» среднее значение экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина, виментина и кератокана в клеточных культурах кератоцитов составило, соответственно: 0,012, 0,027 и 0,126 отн. ед. (**см. рис.**). Среднее значение экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина, виментина и кератокана в клеточных культурах фибробластов составило, соответственно: 0,131, 0,118 и 0,014 отн. ед. (**рис.**). В контрольных клеточных культурах кератоцитов и фибробластов экспрессия характерных маркеров достоверно не отличалась от опытных групп (**рис.**).

Количество экспрессируемого характерного маркера кератоцитов кератокана было статистически значимо выше, чем экспрессия данного белка фибробластами ( $p < 0,0001$ ). При этом количество экспрессируемых характерных маркеров фибробластов –  $\alpha$ -гладкомышечного актина и виментина было статистически значимо выше количества данных маркеров в клеточной культуре кератоцитов ( $p < 0,0001$ ). Отсутствовали достоверные отличия между экспрессией характерных белков в опытной группе (с индукцией интерферона) и в контроле (без добавления индуктора интерферона) ( $p > 0,05$ ).

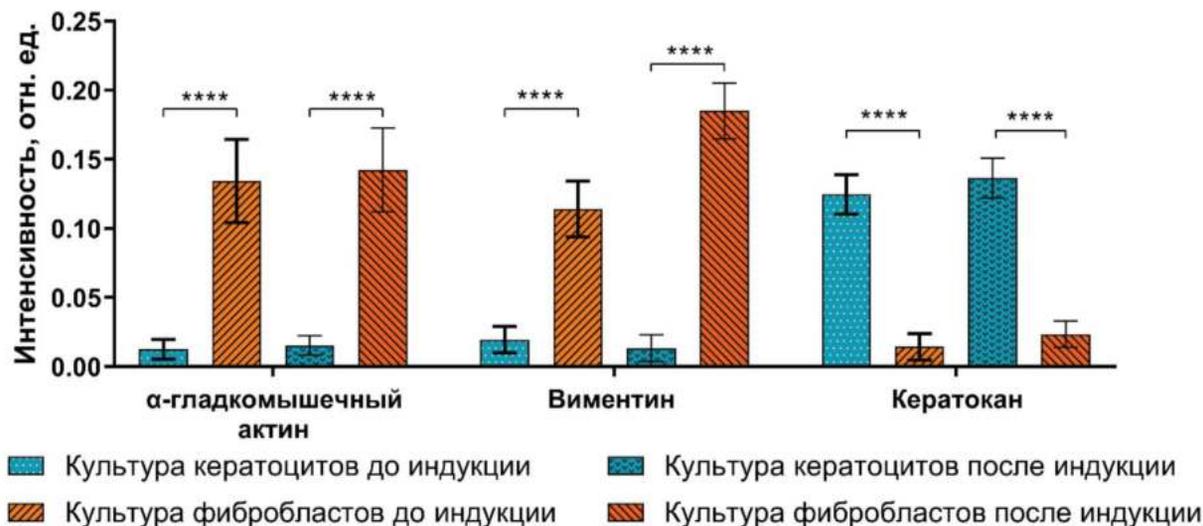
По данным иммуноферментного анализа установлено, что воздействие ростовой среды с индуктором интерферона в концентрации 1 мг/100 мл на клеточные культуры кератоцитов и фибробластов привело к выработке интерферонов 1 типа (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\beta$ ), при достоверно большем количестве выделенного интерферона в клеточной культуре фибробластов по сравнению с клеточной культурой кератоцитов и контролем ( $p < 0,05$ ) (**см. табл.**).

Установлено, что в клеточных культурах кератоцитов и фибробластов после стимуляции индуктором интерферона синтезировалось значительно большее количество интерферонов 1 типа (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\beta$ ) по сравнению с контролем, в котором интерфероны не определялись ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

В данном исследовании проводилась оценка способности клеточных культур кератоцитов и фибробластов продуцировать эндогенный интерферон при стимуляции индукторами интерферона для дальнейшей вирусной деконтаминации ткани донорских роговиц человека от вируса простого герпеса 1 типа.

Имеющиеся данные свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале механизмов врожденно-



Результаты иммуногистохимического исследования: экспрессия характерных маркеров кератоцитов и фибробластов (\*\*\*\* –  $p < 0.0001$ ), отсутствие достоверных отличий между клеточными культурами до индукции и после добавления индуктора интерферона ( $p > 0.05$ ).

Results of immunohistochemistry: expression of characteristic markers of corneal keratocytes and fibroblasts (\*\*\*\* –  $p < 0.0001$ ), absence of reliable differences between cell cultures before induction and after addition of interferon inducer ( $p > 0.05$ ).

**Количество синтезированного эндогенного интерферона-альфа и интерферона-бета в клеточных культурах кератоцитов и фибробластов**

**The amount of synthesized endogenous interferon-alpha and interferon-beta in cell cultures of corneal keratocytes and fibroblasts**

Образец, №	Кератоциты*		Фибробласты*	
	Количество ИФН-α (пг/мл)	Количество ИФН-β (пг/мл)	Количество ИФН-α (пг/мл)	Количество ИФН-β (пг/мл)
1	8,31	12,69	8,81	45,03
2	6,86	15,28	10,97	53,58
3	7,94	12,67	16,31	60,26
4	3,82	13,18	12,14	45,92
5	7,26	10,08	8,42	40,93
6	4,29	14,91	9,81	37,03
7	3,42	10,81	10,33	40,38
8	4,24	20,45	14,56	62,5
9	3,67	8,83	9,38	52,77
10	8,33	17,43	15,32	51,14
11	7,36	11,23	8,96	24,67
12	4,94	8,01	11,83	42,31
13	6,28	9,92	10,25	56,03
14	5,64	10,03	8,56	47,85
15	11,43	12,61	8,69	31,72
M+σ	M+σ = 6,25 (±2,25)	M+σ = 12,54 (±3,36)	M+σ = 10,96 (±2,58)	M+σ = 46,14 (±10,42)

**Примечание.** \* – в контроле значения считались равными нулю, поскольку количество ИФН-α и ИФН-β во всех образцах было ниже порога распознавания.

**Note.** \* – in the control the values were considered to be zero, since the number of IFN-α and IFN-β in all samples were below the recognition threshold.

го иммунитета, однако вопросы их активации в ткани трупной донорской роговицы человека остаются малоизученными. В связи с этим нами было предложено стимулировать механизмы врожденного иммунитета в трупной донорской роговице человека при помощи добавления в состав раствора для консервации роговицы индуктора интерферона, что потенциально способствует запуску противовирусных механизмов в ткани трупной донорской роговицы человека. При этом важным аспектом является субстрат, с которым взаимодействует индуктор интерферона. Так, в строме интактной, здоровой человеческой роговицы, без признаков вирусной инвазии, основной клеточной популяцией являются кератоциты — специализированные клетки мезенхимальной природы, представляющие собой высокодифференцированные фибробласты [12]. При этом известна способность кератоцитов к активации и фенотипическому переходу в фибробласты в результате триггерных воздействий, к которым относят любое потенциально повреждающее воздействие на роговицу (травма, инвазия патогена, в т. ч. вируса, заготовка трансплантата роговицы и т.д.). На сегодня известны работы, в которых описываются фундаментальные отличия в клеточном составе мембран кератоцитов и фибробластов роговицы. Так, в работе N. Ebihara и соавт. впервые сообщается, что белки TLR-3 и TLR-9 экспрессируются фибробластами роговицы, в то время как в кератоцитах данные белки не обнаруживаются [13]. Согласно современным представлениям, дефицит экспрессированных TLR-рецепторов вызывает снижение уровня вырабатываемых клетками интерферонов, что в свою очередь приводит к распространению вируса простого герпеса 1 типа в ткани роговицы [14].

Настоящее исследование учитывает данные отличия в составах клеточных мембран кератоцитов и фибробластов и наглядно демонстрирует практическую значимость фенотипической изменчивости клеточных культур, которую необходимо учитывать при разработке протоколов для вирусной деконтаминации трупных донорских роговиц человека на этапе консервации. По данным проведенного иммуногистохимического исследования кератоциты и фибробласты не изменяли свой фенотип после точечной стимуляции индуктором интерферона.

Таким образом, при инвазии вируса простого герпеса 1 типа кератоциты переходят в фибробласты, в результате чего на их мембранах экспрессируются рецепторные белки TLR-3 и TLR-9, что говорит об активации кератоцитов и запуске механизмов врожденной иммунной системы [7-9]. Индуктор интерферона представляет собой синтетическое химическое вещество, специфически активирующее механизмы врожденного иммунитета. До-

бавление в состав раствора для консервации трупной донорской роговицы человека индуктора интерферона распознается кератоцитами/фибробластами как попадание чужеродного химического вещества, что вызывает появление и активацию PRR-рецепторов, к классу которых относят вышеописанные TLR-3 и TLR-9 [7-9]. Таким образом, добавление индуктора интерферона в состав раствора для консервации трупной донорской роговицы человека потенциально способно приводить к активации механизмов врожденного иммунитета в ткани роговицы, при этом выраженность противовирусного эффекта будет зависеть в том числе от количества экспрессированных рецепторных белков TLR-3 и TLR-9 в конкретной клеточной культуре.

Полученные в настоящей работе результаты согласуются с современными представлениями о физиологической активности кератоцитов и фибробластов: количество выработанного эндогенного интерферона 1 зависит от фенотипа клетки, что было показано в данной работе, а также, по данным литературы, зависит от количества экспрессированных рецепторных белков TLR-3 и TLR-9 в конкретной клеточной культуре.

### Выводы:

1. В результате клеточного культивирования по данным иммуногистохимического исследования клеточные культуры кератоцитов и фибробластов сохраняли свой фенотип до окончания эксперимента.

2. Добавление индуктора интерферона в состав ростовой среды привело к выработке эндогенного интерферона 1 типа (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\beta$ ) в клеточных культурах кератоцитов и фибробластов, выделенных из трупных донорских роговиц человека.

3. Уровни продукции эндогенного интерферона 1 типа (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\beta$ ) в клеточной культуре фибробластов были статистически значимо выше, чем в клеточной культуре кератоцитов ( $p < 0,05$ ), что может быть обусловлено большим количеством экспрессированных рецепторных белков TLR-3 и TLR-9 в клеточной культуре фибробластов, чем в клеточной культуре кератоцитов.

### Литература

(п.п. 1-2; 5; 7-10; 13-14 см. References)

3. Каспаров А.А. Современные аспекты лечения герпес-вирусного кератита. *Клин. офтальмология*. 2000; (2): 59-63.
4. Майчук Ю.Ф. Оптимизация фармакотерапии воспалительных болезней глазной поверхности. *Российский офтальмологический журнал*. 2008; (3): 18-25.
6. Керимов Т.З., Соболев В.П., Соболева М.А., Гаврилова Н.А., Борзенко С.А. Патофизиологические механизмы иммунологи-

ческой деконтаминации вируса простого герпеса 1 типа из роговицы. *Патогенез*. 2020; 18(3): 4-11. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2020.03.4-11>

11. Борзенко С.А., Малугин Б.Э., Гаврилова Н.А. и др. *Алгоритм заготовки трупных роговиц человека для трансплантации*. М.: ГБОУ ВПО МГМСУ МЗ РФ, 2016.
12. Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дисс. ... докт. мед. наук: 14.01.07 / Сергей Анатольевич Борзенко. М.; 2008.

## References

1. Xiao S., Tian Z., Wang Y., et al. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. *Med. Res. Rev.* 2018; 38(3): 951-76. <https://doi.org/10.1002/med.21484>
2. Grüter W. Experimental and clinical studies on so-called corneal herpes. *Berichte über die versammlung der deutschen ophthalmologischen gesellschaft*. 1920; (42): 162-7.
3. Kasparov A.A. Modern aspects of the treatment of herpes virus keratitis. *Klinicheskaya oftal'mologiya*. 2000; (2): 59-63. (In Russian)
4. Maychuk Yu.F. Optimization of pharmacotherapy of inflammatory diseases of the ocular surface. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2008; (3): 18-25. (In Russian)
5. Haller O. A tribute to Jean Lindenmann, co-discoverer of interferon (1924-2015). *Cytokine*. 2015; 76(1): 113-5. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.029>
6. Kerimov T.Z., Sobolev V.P., Soboleva M.A., Gavrilova N.A., Borzenok S.A. Pathophysiological mechanisms of immunological decontamination of herpes simplex virus type 1 from the

cornea. *Patogenez*. 2020; 18(3): 4-11. (In Russian). <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2020.03.4-11>

7. Guo Z.H., Liu P.P., Wang H., et al. Inhibitory effects of luteolin on TLR3-mediated inflammation caused by TAK1/NF- $\kappa$ B signaling in human corneal fibroblasts. *Int. J. Ophthalmol.* 2022; 15(3): 371-9. <https://doi.org/10.18240/ijo.2022.03.01>
8. Kumar V., Stewart J.H. Pattern-recognition receptors and immunometabolic reprogramming: what we know and what to explore. *J Innate Immun.* 2024; 16(1): 295-323. <https://doi.org/10.1159/000539278>
9. Li F., Song B., Zhou W.F., et al. Toll-like receptors 7/8: A paradigm for the manipulation of immunologic reactions for immunotherapy. *Viral Immunol.* 2023; 36(9): 564-78. <https://doi.org/10.1089/vim.2023.0077>
10. Zhu S., Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*. 2021; 12(1): 2670-02. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>
11. Borzenok S.A., Malyugin B.E., Gavrilova N.A., et al. *Algorithm for harvesting human cadaveric corneas for transplantation. [Algorithm zagotovki trupnykh rogovits cheloveka dlya transplantatsii]*. Moscow: GBOU VPO MGMSU MH RF, 2016. (In Russian)
12. Borzenok S.A. Medical, technological and methodological foundations of the effective activities of eye tissue banks in Russia in providing penetrating corneal transplantation operations: diss. ... Doc. of Medicine: 14.01.07 / Sergey Anatolyevich Borzenok. M., 2008. (In Russian)
13. Ebihara N., Yamagami S., Chen L., et al. Expression and function of toll-like receptor-3 and -9 in human corneal myofibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(7): 3069-76. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0968>
14. Koujah L., Suryawanshi R.K., Shukla D. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea. *Cell Mol. Life Sci.* 2019; 76(3): 405-19. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2938-1>

## Сведения об авторах:

**Керимов Тимур Захирович**, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

**Борзенко Сергей Анатольевич**, акад. РАЕН, доктор мед. наук, проф. каф. глазных болезней ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

**Гаврилова Наталья Александровна**, доктор мед. наук, проф., заместитель директора НОИ клинической медицины им. Н.А. Семашко, зав. каф. офтальмологии НОИ клинической медицины им. Н.А. Семашко ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России;

**Островский Дмитрий Сергеевич**, канд. биол. наук, зав. лаб. трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

**Хубецова Мадина Хетаговна**, канд. мед. наук, зав. глазным тканевым банком ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

**Соболев Василий Петрович**, канд. мед. наук, доцент каф. болезней уха, горла и носа ФГАУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

## Обзоры

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616.831-005.1-02:616.34-008.9:579.8

Осиков М.В.<sup>1,2</sup>, Шеломенцев А.В.<sup>1,3</sup>, Шишкова Ю.С.<sup>1</sup>

### Роль оси «микробиота – кишечник – головной мозг» в патогенезе ишемического инсульта

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»,  
454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» Россия,  
454080, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 70;

<sup>3</sup>ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн»,  
454080, Челябинск, Россия, ул. Медгородок, д. 8

**Введение.** В настоящее время инсульт занимает второе место среди причин смертности и третье место среди причин инвалидизации населения в мире несмотря на достигнутые успехи в лечении и профилактики, в связи с этим необходимо определение новых патогенетических мишеней в терапии ишемического инсульта (ИИ). Недавние исследования подчеркивают значительный вклад в патогенез ИИ оси «микробиота-кишечник-головной мозг». **Цель работы** – провести критический анализ данных о роли оси «микробиота – кишечник – головной мозг» в патогенезе ИИ в рецензируемых источниках, индексированных в базах данных Pubmed и Российского индекса научного цитирования за период 2019-2024 гг. по ключевым словам: «микробиота кишечника», «ишемический инсульт», «патогенез».

**Заключение.** Продемонстрировано что ИИ индуцирует кишечный дисбиоз посредством повреждения слизистой оболочки кишечника и кишечного барьера, путем секреции DAMPs, активации TLRs и симпатoadреналовой системы. Условно-патогенная микробиота способна оказывать негативное действие на очаг ишемического повреждения посредством своих сигнальных молекул и метаболитов, так таких как LPS и TMAO, снижая синтез SCFA увеличивает синтез провоспалительных цитокинов в зоне ишемии, вызывает фенотипическую поляризацию микроглии до M1, тем самым поддерживая нейровоспаление, кроме того условно-патогенная микробиота запускает кинурениновый метаболический путь, тем самым снижая синтез мелатонина и его эффекты нейропротекции, опосредованные усиленной экспрессией Bmal1, потенцированием пути Nrf2.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт; патогенез; кишечная микробиота

**Для цитирования:** Осиков М.В., Шеломенцев А.В., Шишкова Ю.С. Роль оси «микробиота – кишечник – головной мозг» в патогенезе ишемического инсульта. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 52–58. DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.52-58

**Участие авторов:** научное руководство, концепция исследования, развитие методологии, итоговые выводы – Осиков М.В.; написание исходного текста, итоговые выводы – Шеломенцев А.В.; научное руководство, редактирование – Шишкова Ю.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Шеломенцев Алексей Викторович, e-mail: avschelomenzew18@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

Поступила 15.07.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

Osikov M.V.<sup>1,2</sup>, Shelomentsev A.V.<sup>1,3</sup>, Shishkova Yu.S.<sup>1</sup>

### The role of the microbiota-gut-brain axis in the pathogenesis of ischaemic stroke

<sup>1</sup>South Ural State Medical University,  
64 Vorovskogo str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;

<sup>2</sup>Chelyabinsk Regional Clinical Hospital,  
70 Vorovskiy str., Chelyabinsk, 454080, Russian Federation;

<sup>3</sup>Chelyabinsk Regional Clinical Therapeutic Hospital for War Veterans,  
8 Medgorodok str., Chelyabinsk, 454080, Russian Federation

**Background.** Currently, stroke is the second leading cause of mortality and the third leading cause of disability in the world despite advances in treatment and prevention; therefore, it is necessary to identify new pathogenetic targets in the therapy of ischaemic stroke (IS). Recent studies have emphasised the significant contribution of the microbiota-intestinal-cerebral axis to the patho-

genesis of IS. **Aim** - to critically analyse the data on the role of the microbiota-gut-brain axis in the pathogenesis of MI in peer-reviewed sources indexed in the Pubmed and Russian Science Citation Index databases for the period 2019-2024 using the following keywords: "gut microbiota", "ischemic stroke", "pathogenesis".

**Conclusion.** It has been demonstrated that AI induces intestinal dysbiosis by damaging the intestinal mucosa and the intestinal barrier through the secretion of DAMPs, activation of TLRs and the sympathoadrenal system, inducing intestinal dysbiosis; opportunistic microbiota is able to exert a pathogenic effect on the focus of ischaemic injury through its signalling molecules and metabolites, such as LPS and TMAO, reduced SCFA synthesis increase the synthesis of pro-inflammatory cytokines in the ischaemic zone cause phenotypic polarisation of microglia to M1, thereby supporting neuroinflammation; in addition, opportunistic microbiota triggers the kynurenine metabolic pathway, thereby reducing melatonin synthesis and its neuroprotective effects mediated by increased expression of Bmal1 and potentiation of the Nrf2 pathway.

**Keywords:** ischaemic stroke; pathogenesis; gut microbiota

**For citation:** Osikov M.V., Shelomentsev A.V., Shishkova Yu.S. The role of the microbiota-gut-brain axis in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Patologicheskaya Fiziologiyai Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 52–58. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.52-58

**Author's contribution:** scientific guidance, research concept, development of methodology, final conclusions – Osikov M.V.; writing the text – Shelomentsev A.V.; scientific guidance – Shishkova Y.S. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** *Shelomentsev A.V.*, e-mail: avschelomenzew18@mail.ru

**Information about the authors:**

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

Shelomentsev A.V., <https://orcid.org/0009-0002-1710-3922>

Shishkova Y.S., <https://orcid.org/0000-0001-8678-6267>

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

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

Received 15.07.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Инсульт занимает второе место среди причин смертности и третье среди причин инвалидизации в мире [1]. В Российской Федерации в течение последних 5 лет было зарегистрировано от 435,2 до 470 тыс случаев инсульта, причем 30% пациентов умирают в течение первого года после эпизода острого нарушения мозгового кровообращения. Кроме того, экономическое бремя последствий инсульта составило более 490 млрд рублей в год, что может свидетельствовать о высоких материально-экономических затратах для оказания медицинской помощи [2]. Несмотря на используемые современные методы диагностики и терапии ишемического инсульта (ИИ) сохраняется неблагоприятный прогноз в отношении здоровья и качества жизни для большинства пациентов, а в связи с поздним обращением пациентов с ИИ за медицинской помощью и значительной затратой времени на диагностические исследования возникает риск развития осложнений и побочных эффектов терапии, направленной на нейропротекцию и использование реперфузионных методов лечения [3]. Патогенез ИИ включает такие механизмы, как нейровоспаление, эк-

сайтотоксичность, оксидативный стресс, гибель нейронов не только в очаге ишемического повреждения, но и в зоне пенумбры [4]. Вследствие ИИ инициируется локальный флогоз, посредством фенотипической поляризации микроглии (M1), которая обеспечивает синтез провоспалительных цитокинов, оказывающих прямое повреждающее действие на нейроны в очаге ишемии [5, 6]. ИИ вызывает дисфункцию АТФ-зависимых ионных каналов, располагающихся в мембране нейронов, в частности, кальциевой АТФ-азы, что приводит к перегрузке кальцием нейронов, повышенному синтезу глутамата и чрезмерной стимуляции N-метил-D-аспартатных рецепторов (NMDAR) на постсинаптической мембране, вызывая деполяризацию митохондрий и активацию оксидативного стресса [7, 8]. Под действием активных форм кислорода формируется переходная митохондриальная пора (МРТР), с дальнейшим выходом цитохрома С и активацией эффекторных каспаз, запуском внутреннего пути апоптоза с синергической активацией внешнего пути, опосредованного провоспалительными цитокинами, включая TNF $\alpha$ / $\beta$ , хемокины, интерлейкин-1 $\beta$

и др., синтезируемые М1 [4, 9, 10]. Невзирая на сложность и обширность патогенетических событий, развивающихся в очаге ишемического повреждения головного мозга, все больше данных свидетельствуют о значимой роли оси «кишечник – микробиота – головной мозг» в патогенезе ИИ [11]. С одной стороны, кишечная микробиота и ее метаболиты оказывают влияние на функциональную активность нейронов головного мозга и нейронов кишечника, посредством нейрональных, эндокринных и иммунных механизмов [12]. Продемонстрировано, что измененный микробиом кишечника может приводить к замедлению энтеральной моторики, усилению эндотоксемии, тем самым потенцируя механизмы местного и системного флогоза [13]. С другой стороны, ИИ повышает проницаемость кишечного барьера, приводя к транслокации в системный кровоток микробиоты и ее продуктов метаболизма, таких как липополисахарид (LPS) и триметиламиноксид (ТМАО), которые оказывают прямое цитотоксическое действие на нейроны головного мозга [1]. Представленные данные актуализируют потребность в дальнейшем изучении взаимосвязи между кишечной микробиотой и основных звеньев патогенеза ИИ, что позволит разработать новые интервенционные подходы для лечения ИИ, направленные на коррекцию кишечного дисбиоза и прерыванию патохимического каскада острой церебральной ишемии [10].

**Целью работы** явился критический анализ данных о роли оси «микробиота – кишечник–головной мозг» в патогенезе ишемического инсульта в рецензируемых источниках, индексированных в базах данных Pubmed и Российского индекса научного цитирования за период 2019-2024 гг. по ключевым словам: «микробиота кишечника», «ишемический инсульт», «патогенез».

### Синтез данных и их анализ

**Стратегия поиска.** Для проведения систематического обзора в базах данных Pubmed и Российского индекса научного цитирования, был произведен поиск соответствующих исследований за 2019-2024 гг. по ключевым словам: «микробиота кишечника», «ишемический инсульт», «патогенез».

**Исключения из исследования.** Были исключены тезисы без полных текстов и обзорные статьи.

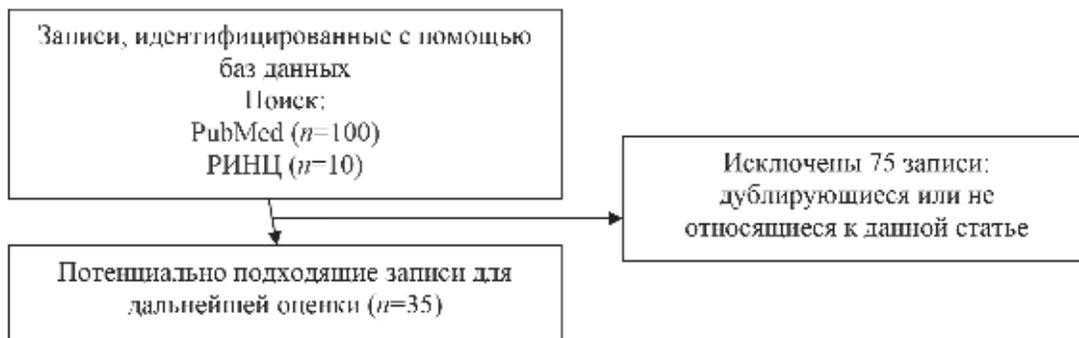
**Извлечение данных.** Из каждого включенного исследования была извлечена следующая информация: авторы, год публикации, область, план исследования.

### Результаты

Стратегия поиска выявила 100 записей из PubMed и 10 из Российского индекса научного цитирования. После исключения дублирующих и нерелевантных записей в статью были включены 35 исследований и проведен анализ их результатов (см. рис.).

#### Влияние ишемического инсульта на микробиоту кишечника

В ходе нескольких исследований показано что, основными представителям микробиоты кишечника у пациентов с инсультом являлись *Megasphaera*, *Enterobacter* и *Desulfovibrio*, что значимо отличалось от здоровых субъектов, где преобладали *Blautia*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae* и *Faecalibacterium* [14-16]. В ряде исследований было доказано, что ИИ вызывает изменения микробиоты кишечника путем активации энтеральной иммунной системы [17]. ИИ индуцирует синтез нейронами молекул, связанных с повреждением (DAMPs), которые посредством связывания с Toll-подобными рецептора-



Блок схема стратегии поиска.  
Block diagram of the search strategy.

ми (TLRs), усиливают экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток сосудов кишечника, вызывая миграцию и последующую инфильтрацию кишечной стенки иммунокомпетентными клетками, такими как нейтрофилы, дендритные клетки, Т-хелперы (Th17, Th1), инициируя локальный флогоз, вызывая гибель эпителиальных и бокаловидных клеток слизистой оболочки кишечника, что приводит к истончению слизистой оболочки кишечного барьера, вызывая обильный рост условно-патогенной флоры [18]. Кишечная слизь состоит в основном из белков муцинов, которые представляют собой сложные агрегаты структурных гликопротеинов со специфическими O-связанными гликанами (O-glycans), являющихся основным источником углерода для комменсальных бактерий кишечника. Истончение слизистой оболочки кишечника приводит к дефициту углерода и гибели резидентной флоры кишечника. Напротив, условно-патогенные бактерии способны к глюконеогенезу, что способствует их избыточному росту [19].

Показано что, при ишемическом инсульте наблюдается избыточный синтез норэпинефрина (NE) в кишечной стенке посредством прямой норадренергической стимуляции пейеровых бляшек кишечника через симпатoadреналовую систему. NE увеличивает скорость роста и экспрессию факторов вирулентности микробиоты кишечника, а также модулирует ее взаимодействие с энтероцитами, приводя к NE-индуцируемой колонизации эпителия кишечника условно-патогенной микробиотой. В исследовании *in vitro* на клетках аденокарциномы ободочной кишки (Cосса2), которые структурно и функционально схожи с энтероцитами тонкого кишечника человека, подвергшиеся инфицированию *Escherichia coli* (AIEC) в присутствии NE, показали что NE значительно усиливал адгезию и инвазию AIEC к Cосса2 посредством экспрессии гена *fim A*. AIEC индуцировала синтез молекулы адгезии, связанной карциноэмбриональным антигеном (CEACAM6) на Cосса2, что приводило к избыточному росту AIEC в культуре клеток [20].

#### **Влияние микробиоты кишечника на патогенез ишемического инсульта**

Источников по данной теме оказалось немного, но в этих исследованиях было показано влияние микробиоты кишечника на основные патогенетические звенья ИИ, такие как оксидативный стресс, нейровоспаление, апоптоз в нервной ткани [21, 22]. Комменсальная и условно-патогенная кишечная микробиота посредством LPS может влиять на внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК) в нейро-

нах ишемического повреждения путем модулирования активности митохондрий через сигнальный путь, связанный с фактором транскрипции Nrf2/элементом антиоксидантного ответа (ARE), который является центральным звеном в антиоксидантной защите клеток. Связывание LPS с Kelch-подобным эпихлоргидрин-ассоциированным белком-1 (Keap1), угнетает процессы убиквитинпротеинизации Nrf2, снижая его транскрипционную активность, приводя к инактивации АФК. В другом исследовании, выполненном на мышах продемонстрировано, что при ИИ *Clostridium butyricum* посредством синтеза бутирата усиливал экспрессию нейротрофического фактора роста головного мозга (BDNF), ингибировал экспрессию Bcl-2 и Bax, приводя к снижению апоптотической гибели нейронов в зоне пенумбры путем прямого фосфолирования нейрональной протеинкиназы-B [21]. Ряд исследований, отражают значительный вклад кишечной микробиоты в индукцию и поддержание нейровоспаления, так *Listeria monocytogenes* способна посредством компонентов клеточной стенки (LPS) и собственных метаболитов (ТМАО) стимулировать дифференцировку эффекторных Т-клеток, повышать проницаемость гематоэнцефалического барьера, а также усиливать инфильтрацию Т-клетками зоны ишемического повреждения, тем самым усугубляя локальный флогоз в очаге ишемического повреждения [22].

Было показано, что представители комменсальной биоты действуют на звенья патогенеза ИИ по-разному. Так, связывание LPS с Kelch-подобным эпихлоргидрин-ассоциированным белком-1 (Keap1) угнетает процессы убиквитин-протеинизации Nrf2, снижая его транскрипционную активность, приводя к инактивации АФК.

#### **Роль сигнальных молекул условно-патогенной микробиоты кишечника и эндогенного мелатонина в патогенезе ишемического инсульта**

Влияние условно-патогенной микробиоты кишечника на патогенез ИИ опосредовано структурными компонентами клеточной стенки бактерий, а также их метаболитами. Среди них все большее значение в патогенезе ИИ занимают липополисахарид (LPS), триметиламиноксид (ТМАО), короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) [23]. LPS обладает выраженным провоспалительным потенциалом, являясь основным компонентом бактериальной стенки грамотрицательных бактерий. ИИ приводит к повышению проницаемости кишечного барьера, вызывая системную эндотоксемию, опосредованную LPS [24]. Так, в исследовании на выполненном на мышах, было показано, что

LPS индуцирует активацию TLR4 на иммунных клетках, эндотелиоцитах и клетках микроглии, что приводит к усиленному синтезу провоспалительных цитокинов, которые могут оказывать прямое цитопатическое действие на нейроны головного мозга [25]. Следует отметить, что значительный вклад в развитие нейровоспаления при ИИ вносит ТМАО, который синтезируется кишечной микробиотой из фосфотидилхолина и L-карнитина, поступающих с пищей. Продемонстрировано, что высокий уровень ТМАО в плазме крови мышей, вызывал фенотипическую поляризацию микроглии до M1, усиливал синтез провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в зубчатой извилине, усиливая вторичное повреждение нейронов головного мозга после инсульта [26]. Показано, что высокие уровни ТМАО в крови способны вызывать гиперагрегацию тромбоцитов, усиливать атерогенез, повышая риск тромбообразования в церебральных артериях [26]. Напротив, SCFA, такие как бутират, ацетат, пропионат, образующиеся посредством анаэробной ферментации пищевых волокон и крахмала, обладают иммуномодулирующим и нейропротективным эффектом [27]. Данные эффекты опосредованы ацетилированием гистонов. Кроме того, SCFA способны активировать рецепторы, связанные с G-белком на энтероэндокринных клетках, приводя к секреции глюкагоноподобного пептида-1 (GLP1), холецистокинина (ССК) и пептида YY (PYY), которые усиливают метаболизм глюкозы, активируют процессы анаэробного гликолиза в нейронах, тем самым уменьшая площадь очага ишемического повреждения в головном мозге [27]. Иммуномодулирующее влияние SCFA при ИИ реализуется посредством потенцирования эффектов интерлейкина-10 (IL-10), снижения синтеза провоспалительных цитокинов в очаге повреждения головного мозга путем подавления активности M1 и T-хелперов 1 типа (Th1). Данные активные метаболиты бактерий снижают экспрессию провоспалительных молекул адгезии эндотелиоцитов-1 (VCAM-1), обеспечивая поддержание целостности ГЭБ при ИИ [27]. Так, в клиническом исследовании обнаружено, что дисбиотические изменения кишечной микробиоты приводили к снижению концентрации SCFA в плазме крови, что коррелировало с большим объемом поражения вещества головного мозга по сравнению с пациентами без дисбиотической трансформации. Таким образом, дисбиоз кишечника увеличивал площадь ишемического повреждения головного мозга путем снижения синтеза SCFA, что нивелирует эффекты нейропротекции и иммуномодуляции данных молекул,

за счет уменьшения активности Treg, M1, количества IL17<sup>+</sup> $\gamma\delta$  T-клеток в зоне ишемического повреждения головного мозга [28].

Кишечные микробные метаболиты, такие как пропионовая и масляная кислота, а также метаболит триптофана индол обеспечивают синтез 5-гидрокси-триптофана (5HT), который усиливает секрецию мелатонина через арилалкиламин-N-ацетилтрансферазу (AANAT) и ацетилсеротонин-O-метилтрансферазу (АСМТ) [29, 30]. Мелатонин способен усиливать экспрессию генов циркадных ритмов Bmal1. Так, в модели ИИ выполненного на мышах было продемонстрировано, что синтез мелатонина при ИИ возрастал, приводя к инактивации ингибиторов протеинкиназы-B (PKB) в нейронах, посредством усиленной экспрессии Bmal1, снижая апоптотическую гибель нейронов в очаге ишемического повреждения. В модели ИИ, на крысах продемонстрировано, что большая концентрация мелатонина содержится в митохондриях печени крыс в сравнении с плазмой крови, при этом ИИ индуцирует выход мелатонина в цитозоль гепатоцитов и далее в системный кровоток с последующим поглощением АФК в зоне ишемии. Показано, что эндогенный мелатонин способен ингибировать путь NF $\kappa$ B, одновременно потенцируя путь Nrf2, снижая секрецию провоспалительных цитокинов в зоне ишемического повреждения [29, 31]. Дисбиоз кишечника, вызванный ИИ, запускает кинурениновый метаболический путь, способствуя синтезу кинуренина из триптофана, снижая образование мелатонина, тем самым нивелируя его эффекты нейропротекции в очаге ишемии [29, 31].

### Заключение

Проведенный анализ литературных данных в рецензируемых источниках, индексированных в базах данных Pubmed и Российского индекса научного цитирования за период с 2019 по 2024 гг., позволяет сделать вывод о том что, ИИ посредством секреции DAMPs, активации TLRs, приводит к изменениям в энтеральной иммунной системе с индукцией локального флогоза кишечной стенки, вызывая повреждение слизистой оболочки кишечника и слизистого барьера, а также к активации симпатoadренальной системы, способствуя формированию дисбиоза кишечника с преобладанием условно-патогенной микробиоты, такой как *Megasphaera*, *Enterobacter* и *Desulfovibrio*. Условно-патогенная микробиота способна оказывать негативное действие на очаг ишемического повреждения посредством своих сигнальных молекул и метаболитов, так таких как, LPS и ТМАО, а сниженный синтез SCFA усиливает продукцию провоспалительных цитокинов

в зоне ишемии вызывает фенотипическую поляризацию микроглии до M1, тем самым поддерживая нейровоспаление, кроме того условно-патогенная микробиота запускает кинурениновый метаболический путь, тем самым снижая синтез мелатонина и его эффекты нейропротекции, опосредованные усиленной экспрессией Bmal1 и потенцированием пути Nrf2.

### Литература/References

- Amado B., Melo L., Pinto R., Lobo A., Barros P., Gomes J.R. Ischemic stroke, lessons from the past towards effective preclinical models. *Biomedicines*. 2022; 10(10): 2561. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102561>
- Arkelius K., Vivien D., Orset C., Ansar S. Validation of a stroke model in rat compatible with rt-PA-induced thrombolysis: new hope for successful translation to the clinic. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 12191. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69081-0>
- Chaparro-Cabanillas N., Arbaizar-Rovirosa M., Salas-Perdomo A., Gallizioli M., Planas A.M., Justicia C. Transient middle cerebral artery occlusion model of stroke. *J Vis Exp*. 2023; (198). <https://doi.org/10.3791/65857>
- Dirnagl U. *Neuromethods*. Vol. 120. Springer; Saskatoon, SK, Canada: 2016. Rodent Models of Stroke.
- Dutra B.G., Tolhuisen M.L., Alves H.C.B.R., Treurniet K.M., Kappelhof M., Yoo A.J., et al. Thrombus imaging characteristics and outcomes in acute ischemic stroke patients undergoing endovascular treatment. *Stroke*. 2019; 50: 2057–64. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.024247>
- Feske S.K. Ischemic stroke. *Am J Med*. 2021; 134(12): 1457–64. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.07.027>
- Gonzalez L.F., Warner D.S., Sheng H., Chaparro E. Endovascular middle cerebral artery embolic stroke model: a novel approach. *J Neurointerv Surg*. 2022; 14(4): 413. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2021-017370>
- Kim G.W., Sugawara T., Chan PH: Involvement of oxidative stress and caspase-3 in cortical infarction after photothrombotic ischemia in mice. *Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20(12): 1690–701. <https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00008>
- Konduri P.R., Marquering H.A., van Bavel E.E., Hoekstra A., Majorie C.B.L.M. INSIST Investigators. In-Silico trials for treatment of acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2020; 11: 558125. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.558125>
- Lemmerman L.R., Harris H.N., Balch M.H.H., Rincon-Benavides M.A., Higuera-Castro N., Arnold D.W., et al. Transient middle cerebral artery occlusion with an intraluminal suture enables reproducible induction of ischemic stroke in mice. *Bio Protoc*. 2022; 12(3): e4305. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4305>
- Lin X., Wang H., Chen J., Zhao P., Wen M., Bingwa L.A., et al. Non-human primate models of ischemic stroke and neurological evaluation after stroke. *J Neurosci Methods*. 2022; 376: 109611. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109611>
- Li Y., Zhang J. Animal models of stroke. *Animal Model Exp Med*. 2021; 4(3): 204–19. <https://doi.org/10.1002/ame2.12179>
- Miller C., Padmos R.M., van der Kolk M., Józsa T.I., Samuels N., Xue Y., et al. In silico trials for treatment of acute ischemic stroke: Design and implementation. *Comput Biol Med*. 2021; 137: 104802. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104802>
- Li N., Wang X., Sun C., Wu X., Lu M., Si Y., et al. Change of intestinal microbiota in cerebral ischemic stroke patients. *BMC Microbiol*. 2019; 19: 191. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1552-1>
- Tan C., Wu Q., Wang H., Gao X., Xu R., Cui Z., et al. Dysbiosis of gut microbiota and short-chain fatty acids in acute ischemic stroke and the subsequent risk for poor functional outcomes. *J Parenter. Enter. Nutr*. 2021; 45: 518–29. <https://doi.org/10.1002/jpen.1861>
- Xia G.-H., You C., Gao X.-X., Zeng X.-L., Zhu J.-J., Xu K.-Y., et al. Stroke dysbiosis index (SDI) in gut microbiome are associated with brain injury and prognosis of stroke. *Front. Neurol*. 2019; 10: 397. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00397>
- Sun H., Gu M., Li Z., Chen X., Zhou J. Gut microbiota dysbiosis in acute ischemic stroke associated with 3-month unfavorable outcome. *Front Neurol*. 2021; 12: 799222. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.799222>
- Renamastika S.N., Wahyuningrum D.R., Putri V.A., Aisy R. Probiotics for Acute Ischemic Stroke. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. 2021; 2021: 1–10. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2021v13i5.41110>
- Trotman-Lucas M., Gibson C.L. A review of experimental models of focal cerebral ischemia focusing on the middle cerebral artery occlusion model. *F1000Research*. 2021; 10: 242. <https://doi.org/10.12688/f1000research.51752.2>
- Gao T., Wang Z., Cao J., Dong Y., Chen Y. Melatonin ameliorates corticosterone-mediated oxidative stress-induced colitis in sleep-deprived mice involving gut microbiota. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2021: 9981480. <https://doi.org/10.1155/2021/9981480>
- Long J., Wang J., Li Y., Chen S. Gut microbiota in ischemic stroke: Where we stand and challenges ahead. *Front Nutr*. 2022; 9: 1008514. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008514>
- Lee J., D'aigle J., Atadja L., Quaicoe V., Honarpisheh P., Ganesh B.P., et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids promote poststroke recovery in aged mice. *Circ Res*. 2020; 127: 453–65. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316448>
- Honarpisheh P., Bryan R.M., McCullough L.D. Aging microbiota-gut-brain axis in stroke Risk and Outcome. *Circ Res*. 2022; 130(8): 1112–44. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.319983>
- Chidambaram S.B., Rathipriya A.G., Mahalakshmi A.M., Sharma S., Hediya T.A., Ray B., et al. the influence of gut dysbiosis in the pathogenesis and management of ischemic stroke. *Cells*. 2022; 11(7): 1239. <https://doi.org/10.3390/cells1107123>
- Kurita N., Yamashiro K., Kuroki T., Tanaka R., Urabe T., Ueno Y., et al. Metabolic endotoxemia promotes neuroinflammation after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020; 40(12): 2505–20. <https://doi.org/10.1177/0271678X19899577>
- Wu W.K., Chen C.C., Liu P.Y., Panyod S., Liao B.Y., Chen P.C., et al. Identification of TMAO-producer phenotype and host-diet-gut dysbiosis by carnitine challenge test in human and germ-free mice. *Gut*. 2019; 68(8): 1439–49. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317155>
- Wang J., Zhang H., He J., Xiong X. The role of the gut microbiota in the development of ischemic stroke. *Front. Immunol*. 2022; 13: 845243. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.845243>
- Hu W., Kong X., Wang H., Li Y., Luo Y. Ischemic stroke and intestinal flora: an insight into brain-gut axis. *Eur J Med Res*. 2022; 27: 73. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00691-2>
- Ma N., Zhang J., Reiter R.J., Ma X. Melatonin mediates mucosal immune cells, microbial metabolism, and rhythm crosstalk: A therapeutic target to reduce intestinal inflammation. *Med. Res. Rev*. 2020; 40(2): 606–32. <https://doi.org/10.1002/med.21628>

30. Rudzki L., Stone T.W., Maes M., Misiak B., Samochowiec J., Szulc A. Gut microbiota-derived vitamins - underrated powers of a multipotent ally in psychiatric health and disease'. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2021; 107: 110240. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110240>
31. Beker M.C., Caglayan B., Caglayan A.B., Kelestemur T., Yalcin E. Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Scientific Reports*. 2019; 9: 19082–2. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55663-0>

**Сведения об авторах:**

**Осиков Михаил Владимирович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»; руководитель, отдел научной работы ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» Россия;

**Шеломенцев Алексей Викторович**, ассистент каф. патофизиологии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»; врач невролог, отделение специалистов терапевтического профиля ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн» Россия;

**Шишкова Юлия Сергеевна**, доктор мед. наук, проф., каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет».

© Рыкунова А.Я., Зверев Я.Ф., 2024

УДК 616-092

**Рыкунова А.Я., Зверев Я.Ф.****Современные представления о патогенезе ревматоидного артрита**ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
656038, Барнаул, Россия, пр. Ленина, д. 40

Обзор посвящен современным представлениям о патофизиологии ревматоидного артрита (РА). Рассмотрены основные звенья аутоиммунного процесса с учетом роли общего эпитопа системы лейкоцитарного антигена человека, значение посттрансляционной модификации ряда белков, главным образом цитруллинирования, а также карбамилрования, ацетилирования, в образовании аутоантител. Особо отмечена роль антигенпрезентирующих клеток, в том числе макрофагов, В-лимфоцитов, дендритных клеток в этом процессе. Обсуждаются значимость клеток врожденного и адаптивного иммунитета, особенно В- и Т-клеток, изменения их пролиферации, дифференцировки, а также нарушение баланса хелперных CD4<sup>+</sup>Т (Th)-клеток в условиях РА. Рассмотрена важная роль провоспалительных цитокинов и хемокинов в развитии воспалительной реакции синовиальной мембраны пораженных суставов. Подчеркнута важность ряда факторов транскрипции, воздействующих на процессы внутриклеточной сигнальной трансдукции и обеспечивающих динамику аутоиммунного воспаления. Отдельно проанализирована значимость рекрутированных и резидентных синовиальных фибробластов в развитии пролиферативного воспаления с образованием паннуса и последующим воздействием на хрящевую и костную ткань. Обсуждаются механизмы разрушения этих тканей, роль активированных хондроцитов, остеокластов и внутриклеточных биохимических каскадов в обеспечении этого патологического процесса. Особый акцент сделан на развитии локальной гипоксии, как одного из важнейших факторов патогенеза РА. Описаны причины возникновения гипоксии, подчеркивается особая роль фактора транскрипции HIF-1α и его связь с другими участниками патологического процесса при РА, такими как внутриклеточные сигнальные каскады NF-κB, JAK/STAT, PI3K-AKT, Notch. Обсуждается энергетический дисбаланс, возникающий в условиях гипоксии, что обуславливает развитие митохондриальной дисфункции, имеющей важное значение в патогенезе РА, что будет рассмотрено во второй части обзора.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит; особенности патогенеза; аутоиммунное воспаление; роль гипоксии**Для цитирования:** Рыкунова А.Я., Зверев Я.Ф. Современные представления о патогенезе ревматоидного артрита.*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 59-70.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.59-70

**Участие авторов:** концепция, написание текста статьи – Рыкунова А.Я.; редактирование, критический анализ – Зверев Я.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.**Для корреспонденции:** Рыкунова Анна Яковлевна, e-mail: zveranna@mail.ru**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.07.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

**Rykunova A.Ya., Zverev Ya.F.****Modern concepts of the pathogenesis of rheumatoid arthritis**Altai State Medical University,  
40 Lenin Ave., Barnaul, 656038, Russian Federation

The review focuses on modern ideas about the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA). The main steps of the autoimmune process are addressed with a consideration of the role of the common epitope in the human leukocyte antigen system as well as the importance of post-translational modification of a number of proteins, primarily citrullination, and also carbamylation and acetylation, in the formation of autoantibodies. The role of antigen-presenting cells, including macrophages, B-lymphocytes, and dendritic cells, in this process is highlighted. The authors discussed the importance of innate and adaptive immune cells, especially B and T cells, changes in their proliferation and differentiation, and the imbalance of helper CD4<sup>+</sup>T (Th) cells in RA. Also, the focus of this review is the contribution of pro-inflammatory cytokines and chemokines to the development of the inflammatory reaction of the synovial membrane of affected joints. The importance of several transcription factors involved in the intracellular signal transduction and providing the dynamics of autoimmune inflammation is emphasized. It was shown that recruited and resident synovial fibroblasts are significant for the development of proliferative inflammation with the formation of pannus and subsequent effects on the cartilage and bone tissue. The authors described the mechanisms for destruction of these tissues and the role

of activated chondrocytes, osteoclasts and intracellular biochemical cascades in maintaining this pathological process. Particular emphasis is placed on the development of local hypoxia as one of the most important factors in the RA pathogenesis. The causes of hypoxia are given along with the special role of the HIF-1 $\alpha$  transcription factor and its connection with other participants in the RA pathological process, such as NF- $\kappa$ B, JAK/STAT, PI3K-AKT, and Notch. The energy imbalance under hypoxic conditions induces mitochondrial dysfunction, which is important in the pathogenesis of RA. This will be discussed in the second part of the review.

**Keywords:** rheumatoid arthritis; pathogenetic features; autoimmune inflammation; role of hypoxia

**For citation:** Rykunova A.Ya., Zverev Ya.F. Modern concepts of the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4) 59–70. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.59-70

**Authors' contribution:** concept, writing the text of the article – Rykunova A.Ya.; editing, critical analysis – Zverev Ya.F. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** Anna Y. Rykunova, e-mail: zveranna@mail.ru

**Information about the authors:**

Rykunova A.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-5889-7071>

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

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

Received 15.07.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Введение

Ревматоидный артрит (РА) – тяжелое хроническое ревматическое аутоиммунное заболевание, поражающее около 1% взрослого населения и сопровождающееся развитием воспалительного процесса в суставах с последующей инвалидизацией, обусловленной деструкцией хряща и костей и нарушениями других органов. Сегодня не вызывает сомнений, что это заболевание является результатом генетической предрасположенности на фоне определенных способствующих факторов внешней среды. Одной из основных проблем в настоящее время является то, что этиологический фактор РА до сих пор не определен. Это затрудняет своевременную диагностику и радикальное излечение заболевания. Что касается ведущих патофизиологических процессов, характеризующих течение РА, здесь ситуация иная, поскольку за последние десятилетия накоплен огромный массив сведений, позволяющий ответить на многие вопросы, возникающие по ходу изучения этой аутоиммунной патологии. Важное значение, на наш взгляд, имеет понимание патофизиологических процессов, происходящих при РА в воспалительном очаге, локализованном в синовиальной оболочке пораженных суставов и изменений, возникающих на уровне клеток, обеспечивающих развитие этого воспаления.

Поиск литературы для подготовки данного обзора проведен с использованием поисковой системы базы данных PubMed (включая MEDLINE) и Scopus, вплоть до 2024 года. Отечественные работы взяты из различных открытых источников, в частности, из базы дан-

ных eLIBRARY. Поиск сосредоточен на патофизиологических механизмах развития РА с использованием ключевых слов: «ревматоидный артрит», «механизмы развития ревматоидного артрита», «гипоксия и ревматоидный артрит», «ангиогенез при ревматоидном артрите», «митохондриальная дисфункция при ревматоидном артрите», «свободно-радикальное окисление при ревматоидном артрите». Всего было проанализировано 208 статей на русском и английском языках в основном за последние 15 лет.

### Основные клеточные механизмы развития ревматоидного артрита

Не вдаваясь в подробности и детали развития РА, исчерпывающе изложенные в целом ряде фундаментальных публикаций последних лет [1-11], отметим, что весьма условно, течение РА можно разбить на 3 фазы: доклиническая, характеризующаяся потерей толерантности к аутоантигену; клинически выраженная с очевидными признаками синовиального воспаления и деструктивная с разрушением хряща, кости и перипартикулярных структур. С перечисленными этапами развития заболевания хорошо согласуется так называемая «гипотеза двух ударов». Согласно этой гипотезе во время «первого удара» происходит первоначальная презентация аутоантигена в местах, удаленных от суставов (лимфоузлы, легочная ткань), во время «второго удара» процесс смещается в суставы с развитием выраженной воспалительной реакции [7, 12]. По ходу заболевания макрофаги, плазматические и дендритные клетки,

лимфоциты, иммунные комплексы пенетрируют синовиальную оболочку и консолидируются в отдельные лимфоидные агрегаты с зародышевыми (герминальными) центрами [5]. Здесь, по-видимому, происходит выработка антител, созревание Т- и В-лимфоцитов, индукция значительного количества провоспалительных цитокинов, активация синовиоцитов, матриксных металлопротеиназ (ММП), хондроцитов (ХЦ), остеокластов (ОК). Это приводит к развитию воспалительной реакции, формированию паннуса, разрушению хряща и кости [10].

Доклиническая фаза РА может длиться годами и характеризуется появлением в сыворотке крови широкого спектра аутоантител.

Первым аутоантителом, обнаруженным при РА, является ревматоидный фактор (РФ), определяемый у 50-80% пациентов и ассоциированный с ухудшением течения заболевания, хотя последнее утверждение до сих пор является предметом дискуссий, как и понимание роли этого аутоантитела при РА [10, 12]. Установлено что IgG-, IgM-, IgA-изотипы РФ прямо взаимодействуют с Fc-фрагментом IgG. Полагают, что иммунные комплексы, образующиеся при взаимодействии РФ с антигеном, усиливают воспаление в синовиальной оболочке суставов, способствуя выработке провоспалительных цитокинов, активируя систему комплемента и рекрутируя нейтрофилы [6, 8].

Существенное внимание уделяется сегодня аутоантителам к белкам, подвергшимся посттрансляционным модификациям. Наибольшее значение имеют, по-видимому, аутоантитела к цитруллинированным белкам (АСРА), являющиеся более специфичными для РА, чем РФ и обнаруживаемые у 50-60% пациентов с ранней фазой и у 60-90% лиц с установленным диагнозом РА. Цитруллинирование представляет собой необратимую посттрансляционную модификацию ряда белков, опосредованную пептидил-аргинин деминазами (PAD) -2 и -4, которые активируются повышенной внутриклеточной концентрацией  $Ca^{2+}$ . В результате происходит замена аминокислоты аргинина на цитруллин. В настоящее время установлено, что некоторые цитруллинированные белки гистонов, коллаген II типа, филлагрин,  $\alpha$ -энолаза, фибриноген, фибронектин, виментин, иммуноглобулин-связывающий белок (BiP) становятся у пациентов с РА мишенью для АСРА [1, 10, 11]. Значение образовавшихся АСРА позволило ряду исследователей в свое время назвать эти аутоантитела «искрой, поджигающей огонь» [13], ответственными за порочный круг, характеризующий хроническое течение РА. Согласно существующему

мнению, образование АСРА в результате цитруллинирования как внутриклеточных, так и внеклеточных белков, происходящего скорее всего в легких, слизистой ротовой полости, кишечнике генетически предрасположенных лиц, можно рассматривать как ответ иммунной системы с помощью активированных благодаря повышенной концентрации  $Ca^{2+}$  PAD [Veale, Fearon, 2017]. Значимость цитруллинированных белков хорошо согласуется с гипотезой об «общем эпитопе», как генетическом факторе, располагающем к развитию РА. В 1987 г. Р.К. Gregersen и соавторы предложили гипотезу «общего эпитопа», которая стала важным этапом в понимании особенностей патогенеза РА. Выяснилось, что у предрасположенных к РА пациентов имеются определенные аллели (DRB4 и DRB6) системы лейкоцитарного антигена человека (HLA), являющегося человеческой версией главного комплекса гистосовместимости II класса (МНСII), локализованного на хромосоме 6 [14]. Отмеченные аллели содержат консервативные последовательности из 5 аминокислот QRRAA (глутамин-лейцин-аргинин-аланин-аланин), обеспечивающие чувствительность к РА. Приведенная аминокислотная последовательность получила название общий эпитоп (HLA-SE). Примечательно, что пока только у АСРА-положительных пациентов с РА удалось выявить ассоциацию с этими аллелями. Показано, что аллели HLA-SE связывают преимущественно цитруллинированные белки, увеличивая количество пептидных комплексов на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК), таких как дендритные клетки (ДК), макрофаги и нейтрофилы. АПК с цитруллинированными антигенами в комплексе с HLA-SE перемещаются в дренирующие лимфоузлы, где активируют иммунные Т-клетки.

К аутоантителам, выявляемым при РА, относятся также другие продукты посттрансляционной модификации, образующиеся в результате карбамилрования, к которым относятся антикарбамиллированные белки (anti-Carb). Карбамилрование представляет собой неферментную посттрансляционную модификацию, в ходе которой происходит взаимодействие изоциановой кислоты со свободными аминогруппами аминокислот, что обуславливает конверсию лизина в гомоцитруллин. Показано, что карбамиллированные белки активируют иммунный ответ Т-клеток, выработку антител и провоспалительных цитокинов, а anti-Carb положительно коррелируют с активностью РА и инвалидизацией пациентов. Вместе с тем, следует отметить, что прямой корреляции между anti-Carb, РФ и АСРА не обнаружено, и для более ранней и точной диагностики РА, по-видимому, следует одновременно опре-

делять в комплексе вышеуказанную комбинацию аутоантител [8].

Посттрансляционная модификация лежит также в основе ацетилирования ряда белков (ААРА) и обнаруживается примерно у 40% пациентов с РА, в основном относящихся к АСРА-позитивной подгруппе. По-видимому, антитела пациентов с РА распознают ацетилизинны, образующиеся у эукариотов с помощью ферментативных реакций. Представляется важным, что способность к ацетилированию собственных белков выявлена у бактерий, что можно ожидать и в отношении пептидов человека. А это указывает на возможность вовлечения изменений микробиома хозяина в развитие РА [1, 15, 16].

Не исключено, что высокой иммуногенностью, обеспечивающей участие в патогенезе РА, обладают обнаруженные при этом заболевании аутоантитела к малоновому диальдегиду и малоновому диальдегиду-ацетальдегиду, а также к уже упоминавшемуся ферменту PAD4, серин-треониновой киназе b-Raf и рибосомальному белку гетерогенному ядерному рибонуклеопротеину A2/B1 (Anti-RA33). Роль этих аутоантител пока далека от понимания, но имеются предположения, что выявляемые у 20-35% пациентов, они способствуют образованию иммунных комплексов и, индуцируя соответствующие цитокины, участвуют в развитии воспалительного процесса в суставах [7, 8].

Образование аутоантигенов обуславливает активацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета. АПК (макрофаги, В-клетки и ДК), содержащие на своей поверхности аутоантигены, процессированные (обработанные) в комплексе с молекулами МНС II, вырабатывают дополнительные костимулирующие сигналы и различные цитокины, активируют поступающие CD4<sup>+</sup> Т-хелперные клетки, стимулируя мембранные TCR-рецепторы последних. Процесс происходит в лимфатических узлах. Здесь в паракортикальной зоне АПК презентуют аутоантигены Т-наивным клеткам, обеспечивая их конверсию в зрелые эффекторные цитотоксические CD8<sup>+</sup> и хелперные CD4<sup>+</sup> Т (Th)-клетки. Последние играют центральную роль на всех этапах развития аутоиммунного процесса. Под влиянием цитокинов при участии разнообразных транскрипционных факторов наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки дифференцируются с образованием ряда субпопуляций, таких как Treg, Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 и Tfh. Важнейшее значение для нормального функционирования иммунной системы имеет баланс Treg-клеток с одной стороны и Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 и Tfh – с другой. Роль Treg-клеток состоит в ослаблении гипериммунного ответа в отношении аутоантигенов и подавлении

иммуновоспалительной реакции, что обуславливает поддержание иммунной толерантности. Отмеченная супрессорная активность клеток Treg обеспечивается высокой экспрессией цитокинов ИЛ-2, ИЛ-10, TGF-β и ИЛ-35, но главным образом – транскрипционного фактора Foxp3, определяющего уровень функциональной активности этих клеток [17, 18]. Установлено, что при РА в условиях неадекватной презентации аутоантигенов Т-клеткам происходит сдвиг отмеченного выше баланса в сторону хелперных клеток Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 и Tfh. Эти клетки инфильтрируют синовиальную оболочку, индуцируют провоспалительные цитокины, среди которых ИЛ-6, ИЛ-1β, IFN-γ, ИЛ-17A-F, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, GM-CSF при активации таких транскрипционных факторов как T-bet, GATA-3, RORγt, Bcl6, а также хемокинов CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL7. Это обуславливает развитие хронического воспалительного процесса. Выяснено, что в сыворотке крови и синовиальной жидкости рост концентрации этих провоспалительных цитокинов прямо коррелирует с тяжестью РА. Показано также, что при РА ряд цитокинов стимулирует дифференцировку наивных Т-клеток в направлении превращения в Th17, а не в Treg. Более того, продемонстрировано, что при артрите Treg, обладая высокой пластичностью, под влиянием некоторых цитокинов трансформируется в наиболее агрессивный провоспалительный фенотип – Th17 клетки. К тому же, в условиях РА Treg, как выяснилось, теряют способность экспрессировать фактор транскрипции Foxp3 [8, 10, 17-23]. В процессе развития воспалительной реакции клетки, рекрутируемые в синовиальную полость, секреторируют цитокины, активирующие резидентные макрофаги и фибробластоподобные синовиоциты (ФПС). Это, во-первых, усиливает воспалительный процесс, во-вторых, способствует формированию внутрисуставного паннуса, а в-третьих, обуславливает разрушение хряща и костной ткани, активируя остеокластогенез. Отметим также перекрестную активацию Т- и В-клеток. Так, реактивные Т-клетки при РА способны обеспечить костимуляцию В-клеток, обеспечивающих продукцию антител.

Следует подчеркнуть, что патогенез РА в значительной степени зависит от В-клеток. Афинное созревание В-клеток, подвергшихся воздействию аутоантигенов, происходит в центрах размножения (зародышевые центры) лимфоидных фолликулов, разбросанных при РА по всему воспаленному синовиуму. Здесь же ДК и макрофаги презентуют аутоантигены зрелым наивным В-клеткам, которые становятся цитруллин-реактивными В-клетками. Большинство

этих лимфоцитов благодаря помощи Т-клеток подвергается соматическим гипермутациям, что приводит к созреванию авидности по отношению к данным антигенам и переключению изотипа иммунного ответа с вовлечением кроме IgG других иммуноглобулинов, что расширяет возможности запуска эффекторных иммунных механизмов [6, 7, 11, 24]. Не исключено, что определенную роль в описываемом процессе играют Толл-подобные рецепторы (TLR), повышенная экспрессия которых выявлена на мембранах клеток синовиальной оболочки. Появились сведения, согласно которым TLR7 и TLR9 индуцируют активацию В-клеток [8, 25].

Активация В-клеток обеспечивается стимуляцией мембранных BCR-рецепторов благодаря взаимодействию с аутоантигенами. Кроме того, как уже упоминалось, для активации В-клетки нуждаются «в помощи» Т-хелперных клеток. Вполне вероятно, что лиганд CD40, экспрессируемый при РА на Т-клетках, обуславливает индукцию костимулирующего сигнала, возбуждающего мембранные рецепторы CD40, что вносит вклад в активацию В-клеток [6, 7, 19, 24]. К индукторам активации В-лимфоцитов при РА, по-видимому, относятся также члены пептидного семейства TNF, такие как фактор активации В-клеток (BAFF) и лиганд А, обеспечивающий пролиферацию (APRIL). Эти поверхностные белки, продуцируемые многими клетками, участвующими в иммунном воспалении, вносят вклад в созревание и выживание В-клеток, способствуя тем самым развитию аутоиммунных заболеваний [8, 19, 26].

Активированные цитруллин-реактивные В-клетки, экспрессирующие изотипы антител IgG, IgA и IgM, мигрируют в синовиальный компартмент, где индуцируют развитие аутоиммунного воспалительного процесса. Из внедрившихся в синовиальную мембрану В-клеток, около 7% приходится на цитруллинированные плазмобласты и плазмциты, продуцирующие аутоантитела уже после попадания в суставную полость [7, 11, 27-29].

Этим роль В-клеток в механизме аутоиммунного процесса не ограничивается. Как уже отмечалось, они функционируют как АПК, путем предъявления костимулирующих молекул для обеспечения созревания и дифференцировки CD4<sup>+</sup> хелперных Т-клеток и их участия в синтезе провоспалительных и регуляторных цитокинов, которые вовлечены в иммунные реакции и прогрессирование воспалительного процесса. В результате презентации аутоантигенов Т-клетки активируются и, в свою очередь, продуцируют цитокины, обеспечивающие дифференцировку В-лимфоцитов

в плазматические клетки с последующим образованием аутоантител. Одновременно CD4<sup>+</sup> Т-клетки, высвобождая GM-CSF и ИЛ-4, способствуют созреванию незрелых ДК. Образующиеся зрелые ДК, в свою очередь, трансдифференцируются в ОК, создавая своеобразный порочный круг прогрессирования тканевого повреждения при РА [11, 23].

Кроме того, как выяснилось, В-клетки у пациентов с РА способствуют продукции лиганда RANKL, который связывается с активатором рецептора NF-κB (RANK) на мембранах предшественников, индуцируя их активность и дифференцировку с конверсией в ОК. ОК же являются ключевыми факторами эрозии костной ткани [30-32].

ДК обладают фагоцитарными свойствами и сильной антигенпрезентирующей способностью. При воздействии аутоантигенов незрелые ДК, происходящие из моноцитов, трансформируются в зрелые и, транспортируя аутоантигены во вторичные лимфоидные органы, активируют Т-клетки для индукции иммунного ответа. Важно отметить, что, мигрируя в суставы на ранних стадиях РА, ДК оказывают существенное влияние на процессы ангиогенеза и лимфангиогенеза в очаге синовиального воспаления. Для этого ДК секретируют ангиогенные факторы роста, включая VEGF-A и ET-1, которые, в свою очередь, активируют транскрипционные факторы CREB, HIF-1α и STAT3, способствующие ангиогенезу. Кроме того, ангиогенез прямо или косвенно активируется рядом проангиогенных хемокинов, высвобождаемых ДК [22, 33-35].

Нельзя не отметить важную роль, которую играют в процессе иммунного воспаления при РА моноциты и макрофаги. Моноциты рекрутируются из кровотока в синовиальный компартмент с помощью хемотаксиса, обеспечиваемого другими аутоиммунными клетками. В синовиальной ткани происходит дифференцировка до классических, промежуточных и неклассических моноцитов в зависимости от наличия тех или иных мембранных рецепторов. Продолжающийся процесс дифференцировки приводит к тому, что классические моноциты трансформируются в провоспалительные макрофаги фенотипа M1 и ОК; промежуточные – в провоспалительные макрофаги фенотипа M1; неклассические – в противовоспалительные макрофаги фенотипа M2. Преобладающей группой при РА является промежуточная подгруппа моноцитов.

Как уже отмечалось, фундаментальной функцией макрофагов как АПК-клеток является индукция иммунного ответа активированными Th-хелперными клетками вследствие презентации аутоантигенов наивным Т-клеткам. Это приводит к высвобождению ци-

токинов и факторов роста. Предполагается, что при РА одновременно происходит сдвиг нормального взаимодействия макрофаги/Т-хелперные клетки в сторону макрофаги М1/Т-хелперные клетки. Это обеспечивается воспалительной окружающей средой в синовиальной мембране, в которой доминируют TLR и интерфероновые сигнальные пути. Результатом является рекрутирование в полость суставов лимфоцитов и нейтрофилов с массивной продукцией провоспалительных цитокинов, факторов хемотаксиса и ММП. В совокупности это способствует остеокластогенезу, эрозии хряща и костей, что приводит к прогрессирующей деструкции суставов [9, 22, 35].

В патогенезе РА важнейшую роль играют макрофаги, как происходящие из проникающих в суставы моноцитов, так и резидентные, выстилающие внутреннюю поверхность синовиальной мембраны.

Наряду с резидентными макрофагами, ключевым элементом, образующим внутренний слой синовиальной мембраны сустава, являются высоко специализированные мезенхимальные клетки – фибробластоподобные синовиоциты (ФПС). В физиологических условиях ФПС продуцируют суставную жидкость, содержащую смазывающие сустав вещества (в частности, гиалуроновую кислоту), которые оптимизируют движение сустава, питают поверхность хряща, формируют синовиальный внеклеточный матрикс (ЕСМ). Однако при РА под влиянием провоспалительных цитокинов, продуцируемых мигрирующими в сустав клетками и комплексами, ФПС приобретают агрессивный и инвазивный фенотип, определяющий развитие заболевания. Пролиферация ФПС обуславливает высвобождение значительного количества провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17), хемокинов (MCP-1, MCP-2), ферментов, индуцирующих воспаление (ЦОГ-2, iNOS), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), RANKL, ММП. С одной стороны, это инициирует и пролонгирует воспалительный процесс в суставах. С другой стороны – вызывает гиперплазию синовиальной оболочки и способствует формированию паннуса. И наконец, активированные ФПС мигрируют в близлежащие хрящи и кости, активируя остеокласты и усиливая деструкцию костей. Причем выяснилось, что миграция ФПС может происходить не только локально, но и через кровоток, способствуя разрушению и отдаленных суставов [10, 12, 23, 32, 36, 37]. Резкое увеличение количества активированных синовиоцитов при РА неизбежно ведет к разрушению хрящевой и костной тканей сустава. ХЦ, как известно, продуцируют коллаген, а также компоненты ЕСМ и обеспечивают гомеостаз хрящевого матрикса и развитие

суставного хряща. Под влиянием ФПС происходит трансформация синовиальной оболочки в гиперпролиферативную структуру, образующую так называемый паннус, который проникает в интерфейс между хрящом и костью и секретирует провоспалительные молекулы, способствующие разрушению хрящевой ткани, ЕСМ и кости [38]. Стимулируя TLR и выделение провоспалительных цитокинов, синовиоциты усиливают экспрессию ММП, которые вносят решающий вклад в активацию ОК, деструкцию хряща и эрозию кости. При РА в синовиальной ткани обнаружено повышенное содержание ММП-1, -2, -3, -7, -9, -10, -12, -13, -14, -25. Являясь цинк-зависимыми протеолитическими ферментами, ММП деградируют компоненты ЕСМ, основные протеогликаны и коллагены суставного хряща в пораженных суставах [32, 39, 40].

При РА решающим фактором в механизме разрушения костной ткани является стимулирующее воздействие на остеокласты. ОК, образующиеся в костном мозге путем дифференцировки линии моноцитов/макрофагов, мигрируют в виде предшественников к костной поверхности. Завершающийся здесь остеокластогенез приводит к созреванию многоядерных ОК, обладающих костно-резорбционной способностью. Они заполняют пространство между воспаленной синовиальной оболочкой и костной поверхностью и обеспечивают деструкцию кости в лакунах резорбции [41, 42]. Сегодня известно о нескольких путях, обуславливающих увеличение количества ОК, а также их созревание, дифференцировку и выживаемость. Основной причиной активации ОК является резкое локальное увеличение содержания RANKL. Цитокин RANKL – мембранный белок семейства фактора некроза опухолевого TNF, основным источником которого являются СФ, а также, возможно, некоторые подтипы Т-лимфоцитов [30]. Выработка RANKL в СФ обеспечивается стимулирующим воздействием рекрутируемых в воспаленный сустав лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов, увеличивающих содержание провоспалительных цитокинов. RANKL взаимодействует с рецепторами RANK, локализованными на мембранах ОК и их предшественников. Это взаимодействие через активацию белка TRAF запускает ряд биохимических внутриклеточных каскадов, реализующих процесс костной резорбции [43]. Таким образом, ФПС становятся одним из основных участников процесса резорбции кости [11, 32, 43, 44]. Отметим также сведения, согласно которым образовавшиеся в процессе РА аутоантитела могут напрямую стимулировать ОК, приводя к образованию костных эрозий. По крайней мере, в свое время *in vitro* и *in vivo* было показано, что

АСРА способны связываться с клеточной поверхностью и усиливать дифференцировку предшественников ОК [45].

### Роль гипоксии в развитии ревматоидного артрита

Мощный воспалительный процесс, захватывающий пораженный сустав, обуславливает развитие глубокой гипоксии всего суставного пространства, включая синовиальную оболочку и синовиальную жидкость, а также хрящевую и костную поверхность. Уже первые прямые измерения парциального давления кислорода ( $pO_2$ ) показали снижение этого показателя с 40-100 мм Нг в норме до 26,5 мм Нг в синовиальной жидкости при РА [46]. Развитие гипоксии в синовиальных тканях обусловлено следующими причинами. В нормальном состоянии внутренняя поверхность сосудов выстлана покоящимися эндотелиальными клетками (ЭК), ориентированными по направлению кровотока и плотно связанными со слоем перицитов. Такая архитектура создает препятствие для выхода клеток крови за пределы сосудистого русла и тем самым значительно ограничивает миграцию лейкоцитов, а также снабжение ткани кислородом. В условиях же развившегося в суставе воспаления активированные ЭК теряют полярность, отделяются от слоя перицитов и выпячиваются в просвет сосуда. Происходит нарушение проницаемости сосудистой стенки, развивается отек стромы, что ограничивает доступ кислорода и питательных веществ в ткани, вызывая их гипоксию. Вторая причина, способствующая развитию гипоксии, обусловлена тем, что открывшийся путь для инфильтрации клеток способствует образованию паннуса, что требует метаболической активации. Возрастает также энергетическая потребность рекрутированных в синовиальную полость активированных иммунных клеток. Резко увеличивающиеся метаболические потребности опережают подачу кислорода через поврежденный эндотелиальный слой, что усугубляет гипоксию [47-51]. В ответ на низкий уровень  $pO_2$  активируется ключевой регулятор кислородного гомеостаза фактор HIF семейства индуцируемых гипоксией факторов, осуществляющих клеточный ответ на гипоксию. Гетеродимерный фактор транскрипции HIF состоит из альфа-субъединиц (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ), экспрессия которых косвенно регулируется наличием кислорода, и бета субъединицы (HIF-1 $\beta$ ), конститутивно экспрессируемой в клеточном ядре. Альфа субъединицы HIF воспринимают кислород непрямо через кислородзависимые пролилгидроксилазы 1-3 (PHD 1-3) и фактор аспарагингидроксилазы, ингибирующий HIF (FIH). В условиях нормального содержания кислоро-

да PHD гидроксилируют пролильные остатки HIF-1 $\alpha$  (pro402 и pro564), что способствует связыванию с белком фон Гиппель-Линдау (pVHL). Являясь убиквитинлигазой E3, VHL обуславливает протеасомную деградацию HIF. При гипоксии активность гидроксилаз ингибируется, субъединицы HIF-1 накапливаются и транслоцируются к ядру, где димеризуются с HIF-1 $\beta$  и его кофактором p300/CBP. Образующийся комплекс связывается со специфическими мотивами ДНК и регулирует транскрипцию сотен генов, которые содержат элементы, ответственные за гипоксию (HRE), вовлеченные в выживание, метаболизм, ангиогенез и инвазию [50-53].

Рост HIF (главным образом HIF-1 $\alpha$ ) установлен в синовиальных тканях пациентов с РА, как и на моделях воспалительного артрита у животных. Не рискуя ошибиться, можно утверждать, что сверхэкспрессия этого фактора транскрипции, имеющая место при гипоксии, существенно активизирует ангиогенез, секрецию провоспалительных медиаторов, активность и инвазивность клеток, участвующих в развитии аутоиммунного процесса [49]. Важно отметить, что повышенная экспрессия HIF-1 $\alpha$  может быть зафиксирована на ранних стадиях гипоксии или кислородного голодания еще до появления клинических признаков болезни. В экспериментах с артритом, индуцированным у мышей, она была определена в синовиальной мембране уже через неделю после инъекции коллагена II типа [54]. Предполагается, что в цитируемом исследовании повышение HIF-1 $\alpha$  происходит у животных быстрее 24 часов после введения индуктора артрита, тогда как для экспрессии HIF-2 $\alpha$  характерно более медленное нарастание. По-видимому, уменьшение потребления кислорода приводит к снижению активности ферментов из семейства PHD и/или FIH, что и обуславливает активацию HIF [54]. Необходимо подчеркнуть, что при РА повышенная экспрессия HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$  выявляется в синовиальной оболочке, резидентных и инфильтрирующих ее клетках, а также в ХЦ и ОК [55]. Показано, например, что избыточная экспрессия индуцируемого HIF-1 $\alpha$  проангиогенного адипокина ANGPTL4 имела место в сыворотке крови и всех типах клеток синовиальной оболочки пациентов с РА. По мнению авторов, это обеспечивает опосредованную ОК резорбцию кости при РА [56].

Следует отметить, что гипоксия, возникающая в поврежденных суставах, опосредует активацию и ряда других взаимосвязанных внутриклеточных сигнальных путей, усугубляющих развитие воспалительного процесса в синовиуме. Среди них активация NF- $\kappa$ B, Notch, JAK-STAT, PI3K-AKT и других. Извест-

но, что активность канонического пути, обеспечиваемого транскрипционным фактором NF- $\kappa$ B, регулирует уровень провоспалительных медиаторов и апоптотического процесса. Показано также, что в биоптатах синовиальной мембраны, взятых у пациентов с воспалительным артритом была обнаружена активация субъединицы NF- $\kappa$ B p65, обусловленная низким уровнем  $pO_2$  [57]. В условиях гипоксии I $\kappa$ B $\alpha$ , внутриклеточный ингибитор NF- $\kappa$ B, подавляется упомянутыми выше гидроксилазами PHD, в результате чего субъединицы NF- $\kappa$ B p65 и p50 транслоцируются в ядро, где активируют транскрипцию таких провоспалительных генов как *TNF*, *IL-1 $\beta$* , *VCAM* и *IL-8* [49]. Следует отметить тесную взаимосвязь сигнальных путей NF- $\kappa$ B и HIF-1 $\alpha$  в ходе развития воспалительного процесса. Возможность этого взаимодействия подтверждается фактом наличия связывающего NF- $\kappa$ B сайта в промоторе HIF-1 $\alpha$ , мутация которого приводит к потере активации HIF-1 $\alpha$  в ответ на гипоксию [58]. Показан также синергизм NF- $\kappa$ B и HIF-1 $\alpha$ , обусловленный гипоксией, в отношении лейкоцитарной инфильтрации, ангиогенеза, инвазивности, экспрессии VEGF в остеокластах [59, 60].

В условиях гипоксии при РА происходит активация трансмембранного белка Notch, являющегося регулятором пролиферации, дифференцировки, ангиогенеза, выживания и апоптоза клеток. После расщепления  $\gamma$ -секретазой NCID, внутриклеточный домен Notch, перемещается к ядру, где стимулирует транскрипцию. *In vivo* обнаружено, что в воспаленном суставе человека гипоксия активирует Notch и ряд связанных с ним других транскрипционных факторов в синовиуме [61]. Поэтому активация сигнального пути Notch при РА обуславливает увеличение продукции провоспалительных цитокинов, синовиальных фибробластов (СФ) и ангиогенез [53, 62]. Отметим, что в отношении Notch и HIF-1 $\alpha$  также выявлено синергетическое взаимодействие в условиях гипоксии [63].

Одним из ключевых факторов, благодаря которым гипоксия влияет на течение РА, является сигнальный путь JAK-STAT, хотя полностью его вклад в патогенез не изучен. Не подлежит сомнениям, что каскад, включающий взаимодействие семейства янус-киназ (JAK) и преобразователей сигналов из активаторов транскрипции (STAT), активировавшись под влиянием сниженного  $pO_2$  в клетках синовиальных тканей, оказывает существенное влияние на протекание воспалительного процесса в пораженных суставах. Установлено, что сигнальный путь JAK-STAT аномально активируется при РА [64, 65]. Высказано предположение, согласно которому указанный путь при РА вовле-

чен в воспаление синовиальной оболочки, аномальную гиперплазию ФПС, эрозию костной ткани [10, 66, 67]. Эксперименты на животных моделях воспалительного артрита подтвердили вовлеченность описываемого сигнального пути в патофизиологические механизмы развития РА [68]. Более того, было продемонстрировано, что опосредованная Notch регуляция воспалительного ответа осуществляется посредством синергетического взаимодействия сигнальных путей NF- $\kappa$ B и JAK-STAT [49]. Показано, что индуцированная гипоксией активация STAT3 стимулирует накопление и активацию HIF-1 $\alpha$  в клетках почечной карциномы, а связывание STAT3 с HIF-1 $\alpha$  оберегает последний от убиквитинирования с помощью VHL [69, 70]. С другой стороны, отметим сведения, согласно которым в условиях молчания HIF-1 $\alpha$  угнеталось влияние STAT3 на миграцию и инвазию ФПС, а ингибирование JAK-STAT3 подавляло индуцированную гипоксией экспрессию HIF-1 $\alpha$  и Notch при РА, как это было показано ранее в отношении стволовых клеток глиобластомы [71, 72]. Резюмируя приведенные данные, упомянем мнение Q. Ding и соавторов, согласно которому STAT1 в синовиальных тканях может проявлять как защитное, так и вредоносное действие, но поскольку при РА его экспрессия в условиях суставного воспаления возрастает в значительной степени, провоспалительный эффект преобладает над противовоспалительным [20]. Примем к сведению эту точку зрения.

Установлено также, что HIF опосредует связанный с гипоксией эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) в ФПС через активацию внутриклеточного сигнального пути PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$ . Такая трансформация фенотипа может привести к значительному усилению миграционной инвазивной способности ФПС в условиях гипоксического микроокружения [73].

На фоне воспаления синовиума, развивающегося при РА, быстрая активация и пролиферация иммунных клеток требует переключения метаболизма с состояния покоя на высокоактивное для поддержания метаболического гомеостаза. В условиях нормального уровня кислорода, как известно, одна молекула глюкозы окисляется путем гликолиза, генерируя две молекулы пирувата, который, проникая в митохондрии, декарбоксилируется с помощью пируватдегидрогеназы (PDH) и включается в цикл трикарбоновых кислот (TCA). В результате же окислительного фосфорилирования в митохондриях на одну молекулу глюкозы образуется более 30 молекул АТФ. Однако в условиях гипоксической окружающей среды в стремлении восполнить энергетический дефицит клетка переходит на переключение окислительного фосфорилирования

в направлении гликолиза. Для этого HIF-1 $\alpha$ , концентрация которого, как уже отмечено, резко возрастает, активирует лактатдегидрогеназу А (LDHA), которая конвертирует пируват в лактат с выработкой двух молекул АТФ. Хотя теперь образуется почти в 20 раз меньше АТФ, чем при полном сгорании в цикле Кребса, более высокая скорость продукции АТФ в целом обеспечивает удовлетворение потребностей активированных иммунных клеток, как и пролиферативных процессов [49, 50, 74, 75]. Таким образом, в пораженных суставах происходит увеличение накопления лактата параллельно со снижением содержания глюкозы в синовиальной жидкости при РА [49, 51]. Выяснилось, что накопление лактата в воспаленном суставе в условиях гипоксии является не просто промежуточным продуктом метаболизма, но может усиливать воспалительную реакцию. Показано, что лактат, продуцируемый СФ при РА, как и при других воспалительных состояниях, воздействует на Т-клетки, моноциты/макрофаги, ДК и ОК, повышая их функциональную активность и дифференцировку, инвазивность ФПС, секрецию провоспалительных медиаторов, что усугубляет течение заболевания [46, 76-78]. Следует отметить, что в воспаленном суставе происходит накопление не только лактата, но и других промежуточных продуктов метаболизма, таких как сукцинат, цитрат, итаконат, которые также принимают активное участие в развитии воспаления в суставах при РА [50, 51].

Поскольку в ходе аутоиммунного процесса при РА происходит активная дифференцировка, пролиферация и миграция иммунных клеток в синовиальных тканях, снижение напряжения кислорода не может не повлиять на их адаптацию к условиям гипоксии. По-видимому, стабилизация уровня HIF-1 $\alpha$  в синовиуме способствует выживанию Т-клеток и повышению их функциональной активности [49, 79, 80]. Кроме того, накапливающийся в условиях гипоксии лактат также, по-видимому, может косвенно воздействовать на Т-клетки. Так, показано, что лактат, накапливаясь в синовиальной оболочке у пациентов с РА, хотя и подавлял подвижность CD4<sup>+</sup> Т-клеток, но переключал их на дифференцировку подтипа Th17 Т-клеток, способствующих, как уже отмечалось, развитию иммунного воспаления [77].

Давно установлено, что гипоксия может влиять на морфологию, выживание, фагоцитоз, метаболическую активность, секрецию цитокинов и активность белков клеточной поверхности макрофагов, что в результате активирует неоваскуляризацию и воспалительную реакцию [81]. А таргетная делеция гена *Hif-1 $\alpha$*  в миелоидных клетках артритных мышей снижала мобильность, инвазивность и бактерицидную активность ма-

крофагов, обуславливая ослабление их синовиальной инфильтрации и уменьшая припухлость суставов [82]. Высказано предположение, согласно которому гипоксия повышает главным образом жизнеспособность М1 макрофагов, использующих для своего функционирования гликолиз, переключение на который, как отмечалось выше, происходит в условиях снижения содержания кислорода в тканях [49, 52, 83].

Существенное влияние гипоксия оказывает на функционирование ДК. В экспериментах *in vitro* было показано, что во время дифференцировки моноцитов в зрелые ДК при гипоксии усиливается экспрессия большого количества генов, в том числе обеспечивающих развитие воспалительной реакции [84]. Затем созревшие ДК запускают дифференцировку Т-клеток в Th2-клетки, играющие заметную роль в аутоиммунном воспалении [85]. Отметим также интересные данные, согласно которым ДК, созревшие в условиях острой гипоксии, проявляют повышенную провоспалительную активность на фоне сниженной способности к миграции. А ДК, созревшие при хронической гипоксии, усиливают экспрессию генов, ответственных за провоспалительный фенотип, склонный к клеточной миграции, адгезии и тканевому ремоделированию [84, 86, 87].

## Литература

(п.п. 4-16; 18; 20-73; 76-87 см. References)

1. Насонов Е.Л. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни. *Научно-практическая ревматология*. 2017; 55(3): 277-94. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2017-277-294>
2. Насонов Е.Л. Современная концепция аутоиммунитета в ревматологии. *Научно-практическая ревматология*. 2023; 61(4): 397-420. <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2023-397-420>
3. Шендригин И.Н., Лиля А.М. Ревматоидный артрит: исторические аспекты. *Современная ревматология*. 2023; 17 (2): 116-24. <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2023-2-116-124>
17. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Рубцов Ю.П. Т-регуляторные клетки при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. 2014; 52(4): 430-7. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-430-437>
19. Зиядуллаев Ш.Х., Худайбердиев Ш.Ш., Арипова Т.У., Ризаев Ж.А., Камалов З.С., Султонов И.И. и др. Иммунные изменения в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите. *Иммунология*. 2023; 44(5): 653-62. <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2023-44-5-653-662>
74. Слепнева Л.В., Хмылова Г.А. Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими растворами. *Трансфузиология*. 2013; 14(2): 49-65.
75. Титова О.Н., Кузубова Н.А., Лебедева Е.С. Роль гипоксического сигнального пути в адаптации клеток к гипоксии. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2020; 4(4): 207-13. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-4-207-213>

## References

- Nasonov E.L. Problems of rheumatoid arthritis. Evolution of the disease. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya*. 2017; 55 (3): 277-94. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2017-277-294> (in Russian)
- Nasonov E.L. Modern concept of autoimmunity in rheumatology *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya*. 2023; 61 (4): 397-420. <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2023-397-420> (in Russian)
- Shchendrigin I.N., Lila A.M. Rheumatoid arthritis: historical aspects. *Sovremennaya Revmatologiya*. 2023; 17(2): 116-24. <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2023-2-116-124> (in Russian)
- McInnes I.B., Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med.* 2011; 365: 2205-19. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>
- Alam J., Jantan I., Nasir S., Bukhari A. Rheumatoid arthritis: recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 92: 615-33. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.055>
- van Delft M.A.M., Huizinga T.W.J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 2020; 110: 102392. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102392>
- Volkov M., van Schie K.A., van der Woude D. Autoantibodies and B cells: the ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol. Rev.* 2020; 294 (1): 148-63. <https://doi.org/10.1111/imr.12829>
- Mueller A-L., Payanden Z., Mohammadkhani N., Mubarak S.M.H., Zakeri A., Bahrami A.A., et al. Recent advanced in understanding the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new treatment strategies. *Cells*. 2021; 10 (11): 3017. <https://doi.org/10.3390/cells10113017>
- Cutolo M., Campitiello R., Gotelli E., Soldano S. The role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis. *Front. Immunol.* 2022; 13: 867260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867260>
- Ding Q., Hu W., Wang R., Yang Q., Zhu M., Li M., et al. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8: 68. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01331-9>
- Nandakumar K.S., Fang Q., Ågren I.W., Bejmo Z.F. Aberrant activation of immune and non-immune cells contributes to joint inflammation and bone degradation in rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24 (21): 15883. <https://doi.org/10.3390/ijms242115883>
- Veale D.J., Orr C., Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.*, 2017; 39(4): 343-54. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0633-1>
- Vossenar E.R., van Venrooij W.J. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2004; 6(3): 107-11. <https://doi.org/10.1186/ar1184>
- Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30(11): 1205-13. <https://doi.org/10.1002/art.1780301102>
- Simon G.M., Cheng J., Gordon J.I. Quantitative assessment of the impact of the gut microbiota on lysine epsilon-acetylation of host proteins using gnotobiotic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(28): 11133-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208669109>
- Ma K-W., Ma W. YopJ family effectors promote bacterial infection through a unique acetyltransferase activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016; 80(4): 1011-27. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00032-16>
- Nasonov E.L., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S., Rubtsov Yu.P. T regulatory cells in rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya*. 2014; 52(4): 430-37. (in Russian). <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-430-437>
- Sun L., Su Y., Jiao A., Wang X., Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8: 235. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>
- Ziyadullaev Sh.Kh., Khydaiberdiev Sh.Sh., Aripova T.U., Rizaev J.A., Kamalov Z.S., Sultonov I.I., et al. Immune changes in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Immunologiya*. 2023; 44(5): 653-62. <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2023-44-5-653-662> (in Russian)
- Noack M., Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13(6): 668-77. <https://doi.org/10.1016/j.aurev.2013.12.004>
- Yang Y., Zhang X., Xu M., Wu X., Zhao F., Zhao Z. Quercetin attenuates collagen-induced arthritis by restoration of Th17/Treg balance and activation of Heme Oxygenase 1-mediated anti-inflammatory effect. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 54: 153-62. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.013>
- Zhang Y., Yang M., Xie H., Hong F., Yang S. Role of miRNAs in rheumatoid arthritis therapy. *Cells*. 2023; 12(13): 1749. <https://doi.org/10.3390/cells12131749>
- Zhu M., Ding Q., Lin Z., Fu R., Zhang F., Li Z., et al. New targets and strategies for rheumatoid arthritis: from signal transduction to epigenetic aspect. *Biomolecules*. 2023; 13(5): 766. <https://doi.org/10.3390/biom13050766>
- Kerkman P.F., Fabre E., van der Voort E.I.H., Zaldumbide A., Rombouts Y., Rispens T., et al. Identification and characterization of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75(6): 1170-76. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-207182>
- Huang Q-Q., Pope R.M. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2009; 11(5): 357-64. <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0051-z>
- Vincent F.B., Saulep-Easton D., Figgitt W.A., Fairfax K.A., Mackay F. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rep.* 2013; 24(3): 203-15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.04.003>
- Kerkman P.F., Rombouts Y., van der Voort E.I.H., Trouw L.A., Huizinga T.W., Toes R.E.M., et al. Circulating plasmablasts/plasmacells as a source of anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72(7): 1259-63. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202893>
- Kerkman P.F., Kempers A.C., van der Voort E.I.H., van Oosterhout M., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M., et al. Synovial fluid mononuclear cells provide an environment for long-term survival of antibody-secreting cells and promote the spontaneous production of anti-citrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75(12): 2201-7. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208554>
- Corsiero E., Bombardieri M., Carlotti E., Pratesi F., Robinson W., Migliorini P., et al. Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75(10): 1866-75. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208356>
- Matsuda K., Shiba N., Hiraoka K. New insights into role of synovial fibroblasts leading to joint destruction in rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(6): 5173. <https://doi.org/10.3390/ijms24065173>

31. Orsini F., Crotti C., Cincinelli G., Di Taranto R., Amati A., Ferrito M., et al. Bone involvement in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis: an updated review. *Biology (Basel)*. 2023; 12(10): 1320. <https://doi.org/10.3390/biology12101320>
32. Tong Y., Li X., Deng Q., Shi J., Feng Y., Bai L. Advances of the small molecule drugs regulating fibroblast-like synovial proliferation for rheumatoid arthritis. *Front. Pharmacol.* 2023; 14: 1230293. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1230293>
33. Bosisio D., Ronca R., Salvi V., Presta M., Sozzani S. Dendriting cells in inflammatory angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 2018; 53: 180-6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.011>
34. Del Prete A., Salvi V., Soriani A., Laffranchi M., Sozio F., Bosisio D., et al. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. *Cell. Mol. Immunol.* 2023; 20(5): 432-47. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-00990-6>
35. Zhao F., He Y., Zhao Z., He J., Huang H., Ai K., et al. The Notch signaling-regulated angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic mechanisms and therapeutic potentials. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1272133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1272133>
36. Wang Y., Chen S., Du K., Liang C., Wang S., Boadi E.O., et al. Traditional herbal medicine: therapeutic potential in rheumatoid arthritis. *J. Ethnopharmacol.* 2021; 279: 114368. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114368>
37. Gravalles E.M., Firestein G.S. Rheumatoid arthritis – common origins, divergent mechanisms. *N. Engl. J. Med.* 2023; 388: 529-42. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2103726>
38. Nygaard G., Firestein G.S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2020; 16(6): 316-33. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0413-5>
39. Li R-L., Duan H-X., Liang Q., Huang Y-L., Wang L-Y., Zhang Q., et al. Targeting matrix metalloproteinases: a promising strategy for herbal medicines to treat rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1046810. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1046810>
40. Pulik Z., Zęgosz P., Motyl G. Matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a state of the art review. *Rheumatologia*. 2023; 61(3): 191-201. <https://doi.org/10.5114/reum/168503>
41. Schett G., Gravalles E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2012; 8(11): 656-64. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.153>
42. Auréal M., Machuca-Gayet I., Coury F. Rheumatoid arthritis in the view of osteoimmunology. *Biomolecules*. 2021; 11(1): 48. <https://doi.org/10.3390/biom11010048>
43. Singh S., Singh T.G., Mahajan K., Dhiman S. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis. *J. Pharm. Pharmacol.* 2020; 7(10): 1306-27. <https://doi.org/10.1111/jph.13326>
44. Xu H., Wang W., Liu X., Huang W., Zhu C., Xu Y., et al. Targeting strategies for bone diseases: signaling pathways and clinical studies. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8(1): 202. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01467-8>
45. Harre U., Georgess D., Bang H., Bozec A., Axmann R., Ossipova E., et al. Induction of osteoclastogenesis in bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(5): 1791-802. <https://doi.org/10.1172/jci60975>
46. Lund-Olesen K. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 1970; 13(6): 769-76. <https://doi.org/10.1002/art.1780130606>
47. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* 2001; 7(8): 345-50. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(01\)02090-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)02090-1)
48. Biniecka M., Canavan M., McGarry T., Gao W., McCormick J., Cregan S., et al. Dysregulated bioenergetics: a key regulator of joint inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75(12): 2192-200. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208476>
49. Fearon U., Canavan M., Biniecka M., Veale D.J. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016; 12(7): 385-97. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.69>
50. McGarry T., Biniecka M., Veale D.J., Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 2018; 125: 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042>
51. Hanlon M.M., Canavan M., Barker B.E., Fearon U. Metabolites as drivers and targets in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 2022; 208: 167-80. <https://doi.org/10.1093/cei/uxab021>
52. Guo X., Chen G. Hypoxia-inducible factor is critical for pathogenesis and regulation of immune cell functions in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1668. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01668>
53. López-Armas M.J., Fernández-Rodríguez J.A., Blanco F.J. Mitochondrial dysfunction oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Antioxidants*. 2022; 11(6): 1151. <https://doi.org/10.3390/antiox11061151>
54. Jeon C.H., Ahn J-K., Chai J-Y., Kim H.J., Bae E-K., Park S.H., et al. Hypoxia appears at pre-arthritis stage and shows co-localization with early synovial inflammation in collagen induced arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008; 26(4): 646-48.
55. Ryu J-H., Chae C-S., Kwak J-S., Oh H., Shin Y., Huh Y.H., et al. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  is an essential catabolic regulator of inflammatory rheumatoid arthritis. *PLoS Biol.* 2014, 12(6): e1001881. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001881>
56. Swales C., Athanasou N.A., Knowles H.J. Angiopoietin-like 4 is over-expressed in rheumatoid arthritis patients: association with pathological bone resorption. *PLoS One*. 2014; 9(10): e109524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109524>
57. Oliver K.M., Garvey J.F., Ng C.T., Veale D.J., Fearon U., Cummins E.P., et al. Hypoxia activates NF- $\kappa$ B-dependent gene expression through the canonical signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 2009, 11(9): 2057-64. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2400>
58. Bruning U., Fitzpatrick S.F., Frank T., Birtwistle M., Taylor C.T., Cheong A. NF- $\kappa$ B and HIF display synergistic behavior during hypoxic inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012; 69(8): 1319-29. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0876-2>
59. Trebec-Reynolds D.P., Voronov I., Heersche J.N.M., Manolson M.F. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF- $\kappa$ B induction of HIF-1  $\alpha$ . *J. Cell. Biochem.* 2010; 110(2): 343-51. <https://doi.org/10.1002/jcb.22542>
60. Li G., Zhang Y., Qian Y., Zhang H., Guo S., Sunagawa M., et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP<sub>2</sub> and MMP<sub>9</sub> expression through NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway. *Moll. Immunol.* 2013; 53(3): 227-36. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.03.001>
61. Gao W., Sweeney C., Connolly M., Kennedy A., Ng C.T., McCormick J., et al. Notch-1 mediates hypoxia-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(7): 2104-13. <https://doi.org/10.1002/art.34397>
62. Chen J., Cheng W., Li J., Wang Y., Chen J., Shen X., et al. Notch-1 and Notch-3 mediate hypoxia-induced activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2021; 73(10): 1810-19. <https://doi.org/10.1002/art.41748>
63. Gustafsson M.V., Zheng X., Pereira T., Gradin K., Jin S., Lundkvist J., et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the un-

- differentiated cell state. *Dev. Cell.* 2005; 9(5): 617-28. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.010>
64. Malemud C.J. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2018; 10(5-6): 117-27. <https://doi.org/10.1177/1759720x18776224>
  65. Simon L.S., Taylor P.C., Choy E.H., Sebba A., Quebe A., Knopp K.L., et al. The Jak/STAT pathway: a focus on pain in rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2021; 51(1): 278-84. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.10.008>
  66. Hammaker D., Nygaard G., Kuhs A., Ai R., Boyle D.L., Wang W., et al. Joint location-specific JAK-STAT signaling in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *ACR Open Rheumatol.* 2019; 1(10): 640-48. <https://doi.org/10.1002/acr2.11093>
  67. Emori T., Kasahara M., Sugahara S., Hashimoto M., Ito H., Narumiya S., et al. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenic behavior of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: effect of the novel JAK inhibitor peficitinib. *Eur. J. Pharmacol.* 2020; 882: 173238. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173238>
  68. Oike T., Sato Y., Kobayashi T., Miyamoto K., Nakamura S., Kaneko Y., et al. Stat3 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 10965. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11233-w>
  69. Jung J.E., Lee H.G., Cho I.H., Chung D.H., Yoon S-H., Yang Y.M., et al. STAT<sub>3</sub> is a potential modulator of HIF-1 mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J.* 2005; 19(10): 1296-98. <https://doi.org/10.1098/fj.04-3099-fje>
  70. Jung J.E., Kim H.S., Lee C.S., Shin Y.J., Kim Y.N., Kang G.H., et al. STAT<sub>3</sub> inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp. Mol. Med.* 2008; 40(5): 479-85. <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.5>
  71. Qiang L., Wu T., Zhang H-W., Lu N., Hu R., Wang Y-J., et al. HIF-1α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 284-94. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.95>
  72. Gao W., McCormick J., Connolly M., Balogh E., Veale D.J., Fearon U. Hypoxia and STAT<sub>3</sub> signaling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74(6): 1275-83. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204105>
  73. Li G-Q., Zhang Y., Liu D., Qian Y-Y., Zhang H., Guo S-Y., et al. p13 kinase/Akt/HIF-1α pathway is associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Mol. Cell Biochem.* 2013; 372: 221-31. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1463-z>
  74. Slepneva L.V., Khmylova G.A. Failure mechanism of energy metabolism during hypoxia and possible ways to correlation of fumaratecontaining solutions. *Transfuziologiya.* 2013; 14(2): 49-65. (in Russian)
  75. Titova O.N., Kuzubova N.A., Lebedeva E.S. The role of the hypoxia signaling pathway in cellular adaptation to hypoxia. *RMZH Meditsinskoe obozrenie.* 2020; 4(4): 207-13. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-4-207-213> (in Russian)
  76. Shime H., Yabu M., Akazawa T., Kodama K., Matsumoto M., Seya T., et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 2008; 180(11): 7175-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7175>
  77. Haas R., Smith J., Rocher-Ros V., Nadkarni S., Montero-Melendez T., D'Acquisito F., et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* 2015; 13(7): e1002202. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002202>
  78. Yi O., Lin Y., Hu M., Hu S., Su Z., Liao J., et al. Lactate metabolism in rheumatoid arthritis: pathogenic mechanisms and therapeutic intervention with natural compounds. *Phytomedicine.* 2022; 100: 154048. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154048>
  79. Makino Y., Nakamura H., Ikeda E., Ohnuma K., Yamauchi K., Yabe Y., et al. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J. Immunol.* 2003; 171(12): 6534-40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6534>
  80. Gaber T., Häupl T., Sandig G., Tykwinska K., Fangradt M., Tschirschmann M., et al. Adaptation of human CD<sub>4</sub> T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. *J. Rheumatol.* 2009; 36(12): 2655-69. <https://doi.org/10.3899/jrheum.090255>
  81. Lewis J.S., Lee J.A., Underwood J.C., Harris A.L., Lewis C.E. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 66(6): 889-900. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.6.889>
  82. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E., Förster I., Pawlinski R., Mackman N., et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cells.* 2003; 112(5): 645-57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00154-5)
  83. Blagih J., Jones R.G. Polarizing macrophages through reprogramming of glucose metabolism. *Cell. Metab.* 2012; 15(6): 793-95. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.008>
  84. Riccardi A., Elia A.R., Cappello P., Puppo M., Vanni C., Fardin P., et al. Transcriptome of hypoxic immature dendrite cells: modulation of chemokine/receptor expression. *Mol. Cancer Res.* 2008; 6(2): 175-85. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0391>
  85. Yang M., Ma C., Liu S., Sun J., Shao Q., Gao W., et al. Hypoxia skews dendritic cells to a T helper type 2-stimulating phenotype and promotes tumour cell migration by dendritic cell-derived osteopontin. *Immunology.* 2009; 128(1 Suppl): e237-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02954.x>
  86. Mancino A., Schioppa T., Larghi P., Pasqualini F., Nebuloni M., Chen I-H., et al. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood.* 2008; 112(9): 3723-34. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142091>
  87. Blengio F., Raggi F., Pierobon D., Cappello P., Eva A., Giovarelli M., et al. The hypoxic environment reprograms the cytokine/chemokine expression profile of human mature dendritic cells. *Immunology.* 2013; 218(1): 76-89. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.02.002>

**Сведения об авторах:**

**Рыкунова Анна Яковлевна**, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России;

**Зверев Яков Федорович**, доктор мед. наук, проф. каф. фармакологии им. проф. В.М. Брюханова ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616.381-002

**Кузнецов М.С.<sup>1</sup>, Михайличенко М.И.<sup>1</sup>, Красильников А.А.<sup>2</sup>****Некоторые особенности адаптивного иммунитета у пациентов с перитонитом**<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, Чита, Россия, ул. Горького, д. 39А;<sup>2</sup>ГУЗ «Краевая клиническая больница», 672000, Чита, Россия, ул. Коханского, д. 7

Обзор посвящен особенностям каскадных взаимодействий звеньев иммунной системы при развитии острого воспаления брюшины. Отражены особенности цитокиновой активности, альтернатива регуляции интенсивности иммунного ответа посредством контрольных иммунных точек, особенности взаимодействий нейтрофилов и роль экстраклеточных нейтрофильных ловушек в развитии адаптивного иммунного ответа. Приведены сведения о динамике развития состояния микроциркуляторного русла в начале заболевания. Особенности затяжного и осложненного течения распространенного гнойного перитонита обусловлены особенностями реакции врожденного и адаптивного иммунитета, гиперактивации и инертности процессов воспаления в париетальной и висцеральной брюшине. Патоген имеет лишь пусковое значение. При этом проведенное оперативное вмешательство не может полностью нивелировать патоморфологические процессы в висцеральной и париетальной брюшине, которые имеют инерционный характер. Необходимо отметить, что избыточная активация и особенности механизмов регуляции иммунного ответа, такие как коингибирующие и коактивирующие иммунные точки, избыточный выброс провоспалительных цитокинов, дисфункция противовоспалительных цитокинов, несёт в себе элемент аутоагрессии, тем самым усиливая деструкцию тканей. Вне всякого сомнения, изучение роли вышеперечисленных маркеров и особенностей иммунитета позволит получить новые звенья патогенеза, на основе которых появится возможность прогнозировать варианты течения перитонита и его отдалённых последствий.

**Ключевые слова:** распространённый гнойный перитонит; контрольные иммунные точки; нейтрофильные экстраклеточные ловушки; цитокины; сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

**Для цитирования:** Кузнецов М.С., Михайличенко М.И., Красильников А.А. Некоторые особенности адаптивного иммунитета у пациентов с перитонитом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 71–79.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.71-79

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала – Михайличенко М.И., Кузнецов М.С.; статистическая обработка, редактирование – Красильников А.А.; написание текста – Кузнецов М.С.; редактирование текста – Михайличенко М.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех ее частей – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Кузнецов Максим Сергеевич, врач-хирург, аспирант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России, e-mail: kms2009chita@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

Поступила 17.10.2024

Принята к печати 14.11.2024

Опубликована 20.12.2024

**Kuznetsov M.S.<sup>1</sup>, Mikhaylichenko M.I.<sup>1</sup>, Krasilnikov A.A.<sup>2</sup>****Features of adaptive immunity in patients with peritonitis**<sup>1</sup>Chita State Medical Academy, 38A Gorky street, Chita, 672000, Russian Federation;<sup>2</sup>Regional Main Clinical Hospital, 7 Kohanskogo street, Chita, 672000, Russian Federation

The review is devoted to the features of cascade interactions of the immune system links during the development of acute peritoneal inflammation. The features of cytokine activity, alternative regulation of the immune response intensity by means of immune checkpoints, features of neutrophil interactions and the role of extracellular neutrophil traps in the development of the adaptive immune response are reflected. Information on the dynamics of the development of the microcirculatory bed at the onset of the disease is provided. Features of the protracted and complicated course of widespread purulent peritonitis are due to the features of the reaction of innate and adaptive immunity, hyperactivation and inertia of inflammatory processes in the parietal and visceral peritoneum. The pathogen has only a triggering value. At the same time, the performed surgical intervention cannot completely neutralize the pathomorphological processes in the visceral and parietal peritoneum, which have an inertial nature. It should be

noted that excessive activation and features of the mechanisms of regulation of the immune response, such as coinhibitory and coactivating immune points, excessive release of proinflammatory cytokines, dysfunction of anti-inflammatory cytokines, carry an element of autoaggression, thereby enhancing tissue destruction. Without a doubt, the study of the role of the above markers and features of immunity will allow us to obtain new links in pathogenesis, on the basis of which it will be possible to predict the options for the course of peritonitis and its long-term consequences.

**Keywords:** widespread purulent peritonitis; immune checkpoints; neutrophil extracellular traps; cytokines; vascular-platelet hemostasis

**For citation:** Kuznetsov M.S., Mikhaylichenko M.I., Krasilnikov A.A. Features of adaptive immunity in patients with peritonitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(4): 71–79. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.71-79

**Author's contribution:** concentration and study design, collection and processing of material – Mikhaylichenko M.I., Kuznetsov M.S.; statistical processing of material – Krasilnikov A.A.; writing the text – Kuznetsov M.S.; editing the text – Mikhaylichenko M.I.; final approval for publication – Mikhaylichenko M.I. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** Maxim S. Kuznetsov, surgeon, graduate student of the department. pathological physiology Chita State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia, e-mail: kms2009chita@mail.ru

**Information about the authors:**

Kuznetsov M.S., <https://orcid.org/0009-0008-8091-4588>

Mikhaylichenko M.I., <https://orcid.org/0000-0001-8660-2982>

Krasilnikov A.A., <https://orcid.org/0009-0002-5180-1214>

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

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

Received 17.10.2024

Accepted 14.11.2024

Published 20.12.2024

## Актуальные проблемы хирургии перитонита

Академик А.Н. Бакулев говорил, что перитонит является никогда не стареющей проблемой. В 1890 г. была написана диссертация Р.М. Осмоловского, в которой впервые в России был систематизирован опыт хирургического лечения перитонита у 180 больных и наблюдалось выздоровление 60% пациентов, тогда как первоначально летальность, за редкими исключениями, была абсолютной [1].

И.И. Греков опубликовал работу «О лечении перитонитов» в 1914 г., в которой он отобразил актуальность проблемы воспаления брюшины того времени. G. Wegner в 1876 г. утверждал: «Мои современники, так же как и я, все, конечно, воспитаны в страхе перед богом и брюшиной, она и по сегодня служит для многих «*noli me tangere*» в худшем виде» [1].

На протяжении всего XX столетия проблема перитонита привлекала особое внимание хирургов всего мира и оставалась актуальной, но, несмотря на достигнутый прогресс в общехирургической технике, методах обезболивания, асептике, антисептике, антибактериальной и дезинтоксикационной терапии остаются вопросы патогенеза воспаления брюшины. В 1971 г. К.С. Симонян вынужден был признать: «Страх перед богом прошёл, а перед брюшиной остался» [1].

Перитонит по сей день остается большой проблемой в современной хирургии. Смертность от последнего колеблется от 25 до 41,5% [2, 3]. Частота развития послеоперационных осложнений варьируется от 10 до 28%, но снизилась за последние годы [4]. Даже на настоящем этапе развития хирургии лечение осложненного воспаления брюшины проблемно [5-8]. Проведённое оперативное вмешательство не позволяет полностью нивелировать патоморфологические изменения висцеральной и париетальной брюшины.

При лечении распространённого гнойного перитонита основными факторами, определяющими эффективность лечения являются время от начала развития перитонита, наличие или отсутствие синдрома системной реакции на воспаление и органной дисфункции. Мангеймский индекс перитонита и шкала APACHE II могут служить основой выбора хирургической тактики. Основными общедоступными вариантами хирургической тактики при распространённом гнойном перитоните остаются полужакрытый и полуоткрытый методы ведения брюшной полости. При распространённом гнойном перитоните хирурги учитывают состояние брюшной полости (мангеймский индекс перитонита, индекс брюшной полости) и исходное общее состоя-

ние больного. Однако в представленных протоколах никак не учтены риски прогрессирования воспаления, что нередко встречается в клинической практике.

Распространённый гнойный перитонит уже через 6 ч приводит к генерализации интраабдоминальной инфекции с выраженными структурными изменениями в стенке кишки и брюшине. Авторы отметили, что у некоторых подопытных животных прогрессирование изменений в стенке кишки присутствовало и через сутки после оперативного вмешательства. Этот факт указывает на то, что санации брюшной полости и декомпрессия тонкой кишки недостаточны для прерывания “каскадного” процесса комплексного воспаления, а также устранения энтеральной недостаточности и эндогенной интоксикации.

Рандомизированные исследования показали, что лучшие результаты лечения достигнуты в случаях ликвидации лапаростомы до 72 ч от начала заболевания. Полученные данные свидетельствуют, что дальнейшие релапаротомии в силу своей высокой инвазивности играют негативную роль в прогрессировании органной недостаточности и в целом ухудшают результаты лечения больного. По прошествии определенного периода выраженность провоспалительной реакции начинает снижаться, а противовоспалительной – наоборот, повышаться. Происходит истощение провоспалительных ресурсов. Подводя итог вышесказанному, очевидно, что после 72 ч наступает точка невозврата в лечении распространённого гнойного перитонита и шансы на успешное излечениекратно снижаются [9].

Патогенетических объяснений описанных выше особенностей воспаления и возможной «хронизации» перитонита мы не обнаружили в современной литературе. Однако ученые приходят к общему мнению и указывают на то, что в основе нетипичного течения перитонита лежат особенности иммунитета и чрезвычайно вариабельные межклеточные взаимодействия у пострадавших.

### **Особенности иммунитета и инкреции цитокинов при перитоните**

Внутрибрюшное давление, нарушение функции желудочно-кишечного тракта потенцируют условия для углубления процессов дезорганизации в системах жизнеобеспечения организма и ведут к активации системной воспалительной реакции [9]. Структура и функциональные возможности брюшины определяют генез воспалительных процессов в брюшной полости. При этом патогенез распространённого гнойного перитонита представлен достаточно сложной системой взаимодействий. Причина воспаления париетальной

и висцеральной брюшины – это воспалительные и деструктивные заболевания органов брюшной полости, нарушение целостности стенок полых внутренних органов, некроз кишечника, несостоятельность швов на стенке полых органов. Деструктивный процесс в брюшной полости последовательно приводит к активации иммунных механизмов [10].

Иммунная система, исключая внутренние органы и лимфатические узлы, представлена скоплениями лимфоидных образований в сальнике и интраабдоминальной брюшной жировой ткани, так же множеством специализированных одиночных солитарных клеток, которые действуют на рубеже врожденного и адаптивного иммунитета [11]. Развитие эндогенной интоксикации вследствие воздействия микробных эндотоксинов и продуктов деструкции тканей являются пусковым моментом каскада иммунных реакций. Ученые утверждают, что эндотоксины сами по себе физиологически индифферентны. Воздействуя на структурные звенья системы иммунитета: моноциты, макрофаги, гранулоциты, лимфоциты, систему комплемента, метаболизм арахидоновой кислоты, последние активируют продукцию интерлейкинов, фактора некроза опухоли и медиаторов воспаления.

Многими авторами в настоящее время перитонит рассматривается в динамике воспалительного процесса, характеризующийся выбросом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [12–15]. Первоначальный этап активации иммунного ответа заключается в себе индукцию пусковых воспалительных медиаторных веществ таких как цитокины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12,  $LT\alpha$ ,  $LT\beta$ , GM-CSF) и фактор некроза опухоли альфа, которые воздействуют на клетки аутокринно. Данный механизм запускает экспрессию дополнительных генов: регуляторных хемокинов активных медиаторов (ИЛ-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP1, PANTES), молекул межклеточной адгезии (VCAM, ICAM, E-селектина), острофазных белков и ферментных систем таких как iNOS COX-2 [16].

Общеизвестно, данный тип патогенетических взаимодействий имеет цепной характер. Во взаимодействие вовлекаются новые, рядом расположенные, популяции моноцитов, нейтрофилов, натуральных киллеров.

Все взаимодействия опосредованы выбросом в межклеточное пространство медиаторов и сигнальных молекул на поверхность мембран. Доказано, что немаловажное значение имеет разрушение микроорганизмов, поскольку при деструкции бактериальной клетки выделяется большое количество гликопротеинов, которые связываясь с комплексом HLA антигенпрезентирующих клеток включают резервные ме-

ханизмы элиминации антигена у пациентов с перитонитом. [17-21].

Экспериментально, на крысах с индуцированным перитонитом, выявлена закономерность секреции определенных типов цитокинов таких как TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-8, относящихся к классу провоспалительных. При этом TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  являются ранними регуляторами иммунного ответа и потенцируют высвобождение вторичных цитокинов, таких как ИЛ-6 и ИЛ-8 [22, 23].

Помимо вышесказанного, в неинтервенционном исследовании при наблюдении за послеоперационными больными, учеными выявлено повышение плазменных показателей противовоспалительных цитокинов в первые трое суток начала воспалительного процесса в полости брюшины (в их случае оперативное лечение): ИЛ-1 $\alpha$ , антагонисты рецепторов TNF- $\alpha$ , ИЛ-18, ИЛ-10, ИЛ-2 и ИЛ-6 [24].

Известно, что особенностью механизма секреции цитокинов, в том числе и пациентов с перитонитом, является каскадность. С течением времени интенсивность иммунных процессов при синдроме системной воспалительной реакции увеличивается [25]. Необходимо указать, что особенностью гнойного воспаления является активация нейтрофилов с последующим усилением их альтеративного действия на окружающие ткани. Стадийное высвобождение провоспалительных цитокинов находится в тесном взаимодействии посредством механизма обратной связи.

Массивный выброс в кровь цитокинов разных классов приводит к дезорганизации адаптационных механизмов регуляции гомеостаза. Сбой, который выражается в неконтрольной активации клеток и превышении плазменных и местных показателей цитокинов, ведет к так называемому цитокиновому шквалу или шторму, что в дальнейшем приводит к иммунопараличу [26-28].

Доказано, что у больных перитонитом возникают гемодинамические нарушения, характеризующиеся последовательной сменой гипердинамического и гиподинамического синдромов. Вазоконстрикция, увеличение сосудистой проницаемости для белка и воды, уменьшение онкотического давления крови приводит к прекапиллярному отеку. Снижается снабжение тканей кислородом и затрудняется удаление из них продуктов метаболизма. По мере прогрессирования процесса наступает расширение прекапилляров и посткапилляров, венул, замедление кровотока и сброс артериальной крови в венозную систему через шунты. Скорость кровотока падает, что способствует образованию в просвете мелких сосудов агрегатов форменных

элементов, происходит гемолиз эритроцитов и комплексное нарушение метаболизм [29].

У пациентов с перитонитом развивающиеся метаболические нарушения провоцируют повышенную проницаемость капилляров, выходу жидкости в межклеточное пространство, гиповолемии, массивной вазодилатации и переполнению венозного русла и как следствие шоку септического генеза. Лихорадка опосредованная действием пирогенов первого и второго порядка, метаболическим ацидозом, ДВС-синдромом, обусловленный нарушением в системе гемостаза, приводят к сепсису и необратимой полиорганной недостаточности [30-32]. Выявленная закономерность демонстрирует повышение секреции воспалительных цитокинов и ее пик наблюдается в течение первых 24 часов со стабилизацией значений к 3-му дню и снижение к 7-му дню. Однако, существуют данные, указывающие на высокие цифры уровня цитокинов и к концу первой недели разлитого воспаления брюшины. Не исключено, что повышение уровня цитокинов является предиктором неблагоприятного и затяжного течения воспаления [33-35].

Достоверные лабораторные наблюдения за динамикой кривых плазменной концентрации демонстрируют, что концентрация TNF- $\alpha$ , ИЛ-6 значительно снижается к 3-му дню, в то время как концентрация ИЛ-1 остаётся стабильно низкой. Встречаются противоречивые данные о корреляции между концентрацией цитокинов в плазме и перитонеальной жидкости. Большинство исследователей наблюдали увеличение концентрации цитокинов в зоне повреждения по сравнению с концентрацией цитокинов в сыворотке крови.

Соотношение индукции уровней провоспалительных и противовоспалительных медиаторов воспаления в очаге альтерации, по литературным данным, не выявлено, мнения авторов по данному вопросу расходятся [36]. Однако, полиморфноклеточная инфильтрация поражённых тканей указывает в сторону активизации иммунных процессов на местном уровне. Следовательно, очаг воспаления является фокусом наибольших межклеточных взаимодействий и продуцентом иммуноактивных веществ.

Вне всякого сомнения, процессы синтеза и реализации функции интерлейкинов лежат в основе течения воспаления в брюшной полости.

### **Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при распространённом гнойном перитоните**

Особенности нарушения кровообращения и повреждения тканей в условиях перитонита и по сей день изучены недостаточно. В частности, механизмы

защиты при повреждении сосудистой стенки реализуются путем повышения адгезии кровяных пластинок к лимфоцитам, так называемый феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, объясняющий тонкую взаимосвязь между системами иммунитета и гемостаза, который вероятно, задействован и при остром воспалении брюшины. Воспалительный процесс способствует изменению структуры мембран клеток, активирует систему гемостаза, вследствие чего повреждается эндотелий и нарушается его экскреторная функция. На фоне вышесказанного происходит прогрессирование нарушения трофики тканей и ведет к «извращению» процессов воспаления, что наблюдается у пациентов с третичным перитонитом [37].

Предполагается, что нарушения в иммунной системе имеют решающее значение для возникновения различных осложнений любого воспаления [38].

При этом характер течения инфекционно-воспалительного процесса в брюшной полости при распространенном гнойном перитоните во многом определяются функциональной активностью нейтрофильных гранулоцитов [39]. Общедоступные сведения о механизмах работы иммунной системы возлагают большую роль в развитии местных воспалительных проявлений на нейтрофилы. Нейтрофилы – высокореактивные клетки иммунной системы, под действием первичных хемоаттрактантов они молниеносно мобилизуются в очаг воспаления и реализуют собственные механизмы элиминации. Самым важным из перечня механизмов элиминации является фагоцитоз, который во многом определяет итог местного воспаления [40, 41].

Предметом особого интереса в нашем случае является перитонеальная жидкость, в которой протекают межклеточные взаимодействия при активации воспаления. Состав перитонеальной жидкости продуцируемой брюшиной в очаге определяется характером патологического процесса.

Изначально при отсутствии воспаления в брюшине клеточный состав перитонеальной жидкости представлен в основном макрофагами, небольшим количеством лимфоцитов (в основном Т-клетками памяти), НК-клеток, полиморфноядерных лейкоцитов, а также дендритными клетками. По мере развития внутрибрюшной катастрофы соотношения клеточных элементов меняется как количественно, так и качественно [42, 43].

Больше всего при индукции воспаления в париетальной и висцеральной брюшине повышается количество лейкоцитов, потому следует полагать, что именно они имеют главенствующую роль [44]. Последним отводится роль в локализации воспаления.

Первично нейтрофильные гранулоциты, обладающие спектром защитных антимикробных эффекторных функций, таких как фагоцитоз, дегрануляция и образование внеклеточных ловушек, вступают во взаимодействие с инфекционным агентом. Интенсивность фагоцитоза регулируется опосредовано системой комплемента, наличием антител IgG и клеточного праймера, составляя несколько минут [45].

Как показывают исследования перитонеальной жидкости, нейтрофилы особенно многочисленны в очаге реакций местного иммунитета, соответственно им отводится роль основного звена врожденного иммунитета. Патогены вызывают воспалительную реакцию, тем самым потенцируют хемотаксис нейтрофилов в патологический очаг.

В очаге воспаления нейтрофилы разрушают микроорганизмы с помощью ряда механизмов, в частности фагоцитоза, высвобождения противомикробных веществ и формируя нейтрофильные экстраклеточные ловушки. Этот процесс, называемый также нетозом, является механизмом уничтожения микроорганизмов нейтрофилами [46-48].

Стадийное высвобождение содержимого гранул нейтрофилов, обладающего высоким окислительным и лизирующим потенциалом, осуществляет контролируемую дегрануляцию и химическим методом выводит патогены, одновременно ограничивая цитотоксическое действие на клетки тканей.

Традиционно считали, что нейтрофилы – это клетки с малым периодом жизни, которые находятся в циркуляции 6-8 часов, находятся в очаге исключительно в острой фазе воспаления и действуют как первичное атакующее звено защиты. Однако недавние результаты исследований показали, что функция нейтрофилов намного шире. Увеличение продолжительности жизни нейтрофилов позволяет длительно персистировать в очаге воспаления. Это явление позволяет нейтрофилам выполнять множество функций в очаге воспаления. Вероятно, установление «гиперактивации и гиперфункции» последних – ключ к пониманию развития третичного перитонита, то есть фактически переход в хроническую форму воспаления листков брюшины [49].

Как было ранее сказано, уровень активности нейтрофилов подвержен цитокиновому влиянию. В начальный период нейтрофил активируется посредством первичного патогена, а именно посредством его контакта с мембраной, гликопротеинами и продуктами распада клеточных структур при разрушении клеточной оболочки микроорганизма. Параллельно нейтрофилы синтезируют и активно секретируют IFN $\gamma$ . Однако на этом

механизм взаимодействия нейтрофила не заканчивается, так как активируются синтез ферментных систем NADPH-оксидазы, миелопероксидазы и аргиназы.

Особо интересен механизм активации посредством NADPH-оксидазы, которая запускает формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек, которые связывают, инактивируют и повреждают структуру патогена посредством перекисных соединений кислорода и азота. Рассматривая механизм раскрытия нейтрофильных экстраклеточных ловушек ученые отметили, что во внеклеточную среду поступает аргиназа, тем самым понижая концентрацию аргинина, опосредованно данным механизмом развивается торможение активности Т-лимфоцитов.

Раскрытие нейтрофильных ловушек прекращается на фоне прекращения экспрессии TLR-рецепторов на поверхности мембран, что происходит под влиянием Toll-взаимодействующего белка. Увеличение активности Т-лимфоцитов на фоне отсутствия выхода аргиназы из нейтрофилов создает условия для активации механизмов адаптивного иммунитета.

Соответственно, изучение и расширение знаний о метаболизме нейтрофилов с их двусторонней связью с инкретируемыми интерлейкинами, особенностями нетоза, еще одно звено в понимании процессов, происходящих при воспалении брюшины.

### Контрольные иммунные точки при перитоните

Наиважнейшую роль в регуляция Т-клеточного звена и специфического иммунитета играют контрольные иммунные точки. Они задают вектор развития воспаления на уровне межклеточного взаимодействия у пациентов с перитонитом.

В настоящий момент данный механизм изучен недостаточно, но известно, что основной путь костимуляции состоит в связывании белка CD28. Последний находится на поверхности мембраны Т-клеток и активируется при помощи костимуляторных молекул (B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86)) находящихся на активированных антигенпрезентирующих клетках. Так же для регуляции данного механизма существуют контрольные иммунные точки для снижения активации клеточного иммунитета. К ним относятся цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 – CTLA4, CD152), который появляется при активации Т-клеток. Связываясь с CD80/86 тормозит образование Т-клеток за счет большей чувствительности, и образуются Т-регуляторные клетки участвующие в формировании периферической толерантности. Данные иммунные точки появляются на ранней стадии и преимущественно в лимфоидных тканях.

Следующим важным компонентом регуляции является рецептор программируемой смерти 1 (programmed death-1; PD1), его функция пересекается с CTLA4, но также имеет свои особенности: способствует развитию и функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов и напрямую подавляет функцию антиген-специфических Т-эффекторных лимфоцитов, что защищает ткани от потенциально патогенных Т-эффекторных лимфоцитов. Механизм запускается на поздних стадиях и преимущественно в периферических тканях (на эпителиальных клетках, клетках эндотелия сосудов и опухолевых клетках) за счет чего имеет более широкий спектр Т-клеточных сигнальных путей [50].

При этом в современной литературе абсолютно отсутствуют данные о контрольных иммунных точках при воспалении брюшины. Также отсутствует информации о коингибирующих и коактивирующих молекулах у пациентов с перитонитом. Возможно, «коактивация» является плацдармом для гиперовоспаления брюшины и растягивания процессов уже «аутоальтерации» брюшины. Возникает вопрос, может ли иммунотерапия быть эффективной при лечении перитонита. Этот факт придется установить в будущем.

По данным В.А. Косинец, И.В. Самсоновой, экспериментальное моделирование распространённого гнойного перитонита у животных приводило к развитию выраженных изменений в стенке кишечника. Исследование стенки кишки на 6, 24, 72 ч после начала заболевания выявило стадийные изменения в кровообращении и лимфообращении, что впоследствии приводило к тотальному некрозу ворсин, диффузной умеренно выраженной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрации, причём по направлению от проксимальных к дистальным отделам состав инфильтрата качественно менялся от преимущественно лимфо-макрофагального до нейтрофильно-клеточного [51].

### Заключение

Соответственно, распространённый гнойный перитонит уже через 6 часов приводит к генерализации интраабдоминальной инфекции с выраженными структурными изменениями в стенке кишки и брюшине. Авторы отметили, что у некоторых подопытных животных прогрессирование изменений в стенке кишки присутствовали и через сутки после оперативного вмешательства. Этот факт указывает на то, что санации брюшной полости и декомпрессия тонкой кишки недостаточны для прерывания «каскадного» процесса комплексного воспаления, а также устранения энтеральной недостаточности и эндогенной интоксикации [52].

Особенности затяжного и осложнённого течения распространённого гнойного перитонита обусловлены особенностями реакции врождённого и адаптивного иммунитета, гиперактивации и инертности процессов воспаления в париетальной и висцеральной брюшине. Патоген имеет лишь пусковое значение. При этом проведённое оперативное вмешательство не может полностью нивелировать патоморфологические процессы в висцеральной и париетальной брюшине, которые имеют инерционный характер.

Необходимо отметить, что избыточная активация и особенности механизмов регуляции иммунного ответа, такие как коингибирующие и коактивирующие иммунные точки, избыточный выброс провоспалительных цитокинов, дисфункция противовоспалительных цитокинов, несет в себе элемент аутоагрессии, тем самым усиливая деструкцию тканей.

В настоящий момент нет работ, объясняющих механизмы развития осложнённого течения перитонита, при, казалось бы, всестороннем подходе к лечению и полноте лечебных манипуляций. Собирая данные об этих процессах на клеточном уровне в перитонеальном экссудате, по данным современной литературы, мы пришли к выводу, что предикторами тенденции воспаления в сторону регрессии являются нейтрофилы. В связи с этим, патогенетические механизмы ослабления или чрезмерного усиления иммунного ответа посредством огромного количества участников являются важнейшей составляющей при осложнённом течении вторичного и послеоперационного перитонита.

Вне всякого сомнения, изучение роли вышеперечисленных маркеров и особенностей иммунитета позволит получить новые звенья патогенеза, на основе которых появится возможность прогнозировать варианты течения перитонита и его отдаленных последствий.

### Литература

(п.п. 11; 15-16; 18; 20; 22-27; 30-36; 38; 41-44; 46; 47; 49 см. References)

- Анисимов А.Ю., Галимзянов А.Ф., Галяутдинов Ф.Ш., Зимагулов Р.Т., Мустафин Р.Р. Диагностическая и лечебная тактика у больных распространённым перитонитом. *Практическая медицина*. 2007; 2(21): 35-43.
- Асан Т.Б., Балтабаева У.Б., Бегалы А.К., Кайып Н.М., Рахман Н.Н., Сарыбай А.А. и др. Основные причины летальных исходов при распространённом гнойном перитоните. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2020; 4: 349-54.
- Седов В.М., Избасаров Р.Ж., Стрижелецкий В.В. Программированная санационная лапароскопия в лечении перитонита. *Вестник хирургии*. 2008; 1: 88-91.
- Суковатых Б.С., Блинков Ю.Ю., Букреева А.Е., Ештокин С.А., Иванов П.А. Лечение распространённого гнойного перитонита. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2012; 9: 42-7.
- Сараев А.Р., Назаров Ш.К. Патогенез и классификация распространённого перитонита. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2019; 12: 106-10. <https://doi.org/10.17116/hirurgia2019121106>
- Покровский Е.Ж. Анализ причин летальных исходов при распространённом перитоните. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2012; 17(1): 29-32.
- Лесовик В.С. Профилактика развития гнойно-септических осложнений при перитонитах разной этиологии с учетом сниженной реактивности организма. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2023; 6: 27-33. <https://doi.org/10.17116/hirurgia202306127>
- Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Филимонова М.И. *Перитонит*. М.: Литтерра; 2006.
- Брискин Б.С., Хачатрян Н.Н., Савченко З.И. Лечение тяжелых форм распространённого перитонита. *Хирургия*. 2003; 8: 56-9.
- Булава Г.В. Иммунные механизмы в патогенезе острого перитонита. *Трансплантология*. 2023; 15(1): 89-97. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-1-89-97>
- Плоткин Л.Л., Бордуновский В.Н., Парфенова О.В. Прогностическая роль интерлейкина-6 перитонеального экссудата у пациентов с распространённым перитонитом. *Вестник хирургии*. 2009; 5: 17-9.
- Власов А.П., Радайкина О.Г., Власов П.А., Шевалаев Г.А., Болотских В.А., Мелешкин А.В. Цитокиновый профиль больных с тяжёлой хирургической патологией. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 2-3: 38-42.
- Косинец В.А. Этиопатогенетические аспекты возникновения и развития распространённого гнойного перитонита. *Новости хирургии*. 2005; 13(1-4): 10-5.
- Гаджиев Н.Дж., Климова Е.М., Насиров М.Я., Сушков С.В., Дроздова Л.А. Динамика цитокинов у больных с распространённым перитонитом. *Забайкальский медицинский вестник*. 2012; 2: 106-10.
- Глоба А.Г., Дикова О.Н., Демидова В.С., Карелин А.А. Изучение экспрессии генов цитокинов и факторов апоптоза в крови и тканях пациентов с хирургической инфекцией методом ПЦР реального времени. *Биомедицинская химия*. 2006; 52(6): 608-14.
- Чепурных Е.Е., Шурыгина И.А., Шаульская Е.С., Шурыгин М.Г. Роль цитокинов в патогенезе развития распространённого гнойного перитонита. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016; 1(4): 177-82.
- Матвеева В.Г., Головкин А.С., Григорьев Е.В., Понасенко А.В. Роль триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках, в активации врождённого иммунитета. *Общая реаниматология*. 2011; 7: 74.
- Руднов В.А., Кулабухов В.В. Сепсис и терагностика на пути к персонализированной медицине. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2015; 6: 60-7.
- Трусова Ю.С., Шаповалов К.Г. Изменения микроциркуляторного гемостаза у больных с перитонитом на фоне артериальной гипертензии. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2012; 5(2): 287-90.
- Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. *Иммунометаболические нарушения при распространённом гнойном перитоните*. Новосибирск: Наука; 2013.
- Ярилин А.А. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

45. Давыдов Ю.А., Ларичев А.Б., Волков А.В. *Общий гнойный перитонит*. Ярославль: Диа-пресс; 2000.
48. Борисов Р.Н., Белобородов В.А. Результаты лечения распространённого гнойного перитонита. *Сибирское медицинское обозрение*. 2009; 1: 93-5.
50. Насонов Е.Л. Ингибция иммунных контрольных точек и аутоиммунитет: ревматологические проблемы. *Научно-практическая ревматология*. 2018; 56(1): 5-9. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-5-9>
51. Косинец В.А., Самсонова И.В. Структурные изменения внутренних органов при экспериментальном гнойном перитоните. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2007; 6(4): 39-46.
52. Здзиковский Д.Э., Борисов Р.Н. Варианты хирургической тактики при распространённом гнойном перитоните. *Сибирское медицинское обозрение*. 2010; 6: 68-72.
13. Vlasov A.P., Radaykina O.G., Vlasov P.A., Shevalaev G.A., Bolotskikh V.A., Meleshkin A.V. Cytokine profile in patients with severe surgical pathology. *Sovremennye Problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 2-3: 38-42. (In Russian)
14. Kosinets V.A. Etiopathogenic aspects of the emergence and development of a widespread purulent peritonitis. *Novosti khirurgii*. 2005; 13(1-4): 10-5. (In Russian)
15. Banyer J.L., Hamilton N.H., Ramshaw I.A., Ramsay A.J. Cytokines in innate and adaptive immunity. *Reviews In Immunogenetics*. 2000; 2(3): 359-73.
16. Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4): 1162-72. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
17. Gadzhiev N.J., Klimova E.M., Nasirov M.Y., Sushkov S.V., Drozdova L.A. Dynamics of cytokines in patients with generalized peritonitis. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2012; 2: 106-10. (In Russian)
18. Deutschman C.S., Tracey K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014; 40(4): 463-75.
19. Globa A.G., Dikova O.N., Demidova V.S., Karelin A.A. Study of the expression of cytokine genes and apoptosis factors in the blood and tissues of patients with surgical infection using real-time PCR. *Biomeditsinskaya Himiya*. 2006; 52(6): 608-14. (In Russian)
20. Wiersinga W.J., Leopold S.J., Cranendonk D.R. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014; 5(1): 6-44.
21. Chepurnyh E.E., Shurygina I.A., Shaul'skaja E.S., Shurygin M.G. Role of cytokines in the pathogenesis of diffuse bacterial peritonitis. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016; 1(4): 177-82. (In Russian)
22. Hendriks T., Bleichrodt R.P., Lomme R.M., De Man B.M., van Goor H., Buysse O.R. Peritoneal cytokines predict mortality after surgical treatment of secondary peritonitis in the rat. *Journal of the American College of Surgeons*. 2010; 211(2): 263-70.
23. Herwig R., Glodny B., Kühle C., Schlüter B., Brinkmann O.A., Strasser H., et al. Early identification of peritonitis by peritoneal cytokine measurement. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2002; 45(4): 514-21.
24. Maruna P., Gürlich R., Frasko R., Chachkhiani I., Marunová M., Owen K., et al. Cytokines and soluble cytokine receptors in the perioperative period. *Sbornik lekarsky*. 2002; 103(2): 273-82.
25. Deutschman C.S., Tracey K.J. Sepsis: current dogma and new Perspectives. *Immunity*. 2014; 40(4): 463-75.
26. Cavaillon J.M. Pro-versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cellular And Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2001; 47(4): 695-02.
27. Fieren M.W. The local inflammatory responses to infection of the peritoneal cavity in humans: their regulation by cytokines, macrophages, and other leukocytes. *Mediators of inflammation*. 2012; Patent 976241. <https://doi.org/10.1155/2012/976241>
28. Matveeva V.G., Golovkin A.S., Grigoriev E.V., Ponasenko A.V. Role of the trigger receptor expressed on myeloid cells, in activation of innate immunity. *Obshchaya Peanimatologiya*. 2011; 7: 74. (In Russian)
29. Rudnov V.A., Kulabukhov V.V. Sepsis and teragnostics. on the way to personalized medicine. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2015; 6: 60-7. (In Russian)
30. Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Salmasi Z.M., Semenova L.Y. Endogenous regulators of the immune system (sCD100, Malonic Dialdehyde, and Arginase). *Bulletin Experimental Biology and Medicine*. 2018; 164(5): 693-700. <https://doi.org/doi: 10.1007/s10517-018-4061-6>
31. Buchbinder E.I., Desari A. CTLA-4 and PD-1 pathways. Similarities, differences, and implications of their inhibition. *American Journal of*

### References

1. Anisimov A.Y., Galimzyanov A.F., Galyautdinov F.Sh., Zimagulov R.T., Mustafin R.R. Diagnostic and therapeutic tactics in patients with disseminated peritonitis. *Prakticheskaya Meditsina*. 2007; 2(21): 35-43. (in Russian)
2. Assan T.B., Baltabayeva U.B., Begaly A.K., Kaiyp N.M., Rakhman N.N., Sarybay A.A., et al. Main causes of lethal outcomes in generalized peritonitis. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo Meditsinskogo Universiteta*. 2020; 4: 349-54. (in Russian)
3. Sedov V.M., Izbasarov R.Zh., Strizhelekkij V.V. Programmed sanitation laparoscopy in the treatment of peritonitis. *Vestnik Khirurgii*. 2008; 1: 88-91. (In Russian)
4. Sukovatykh B.S., Blinkov Iu.Iu., Bukreeva A.E., Eshtokin S.A., Ivanov P.A. Treatment of the diffuse septic peritonitis. *Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova*. 2012; 9: 42-7. (In Russian)
5. Saraev A.R., Nazarov Sh.K. Pathogenesis and classification of advanced peritonitis. *Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova*. 2019; 12: 106-10. (In Russian). <https://doi.org/10.17116/hirurgia2019121106>
6. Pokrovskij E.Zh. Analysis of the causes of deaths in generalized peritonitis. *Vestnik Ivanovskoy Meditsinskoy Akademii*. 2012; 17(1): 29-32. (In Russian)
7. Lesovik V.S. Prevention of the development of additional purulent-septic complications in peritonitis of various etiologies, taking into account reduced reactivity. *Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova*. 2023; 6: 27-33. (In Russian) <https://doi.org/10.17116/hirurgia202306127>
8. Savel'ev V.S., Gel'fand B.R., Filimonova M.I. *Peritonitis [Peritonit]*. Moscow: Litterra; 2006. (In Russian)
9. Briskin B.S., Hachatryan N.N., Savchenko Z.I. Treatment of severe forms of widespread peritonitis. *Khirurgiya*. 2003; 8: 56-9. (In Russian)
10. Bulava G.V. Immune mechanisms in the pathogenesis of acute peritonitis. *Transplantologiya*. 2023; 15(1): 89-97. (In Russian). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-1-89-97>
11. Schäffler A., Schölmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in Immunology*. 2010; 31(6): 228-35. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.03.001>
12. Plotkin L.L., Bordunovskij V.N., Parfenova O.V. Prognostic role of interleukin-6 peritoneal exudate in patients with widespread peritonitis. *Vestnik khirurgii*. 2009; 5: 17-9. (In Russian)

- Clinical Oncology*. 2016; 39(1): 98-106. <https://doi.org/doi: 10.1097/COC.0000000000000239>
32. Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y., Ali M.M., McGuire F., Nagarkatti P.S., et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*. 2013; 27(6): 669-84.
  33. Badiu D.C., Paunescu V., Aungurenci A., Pasarica D. Proinflammatory cytokines in peritonitis. *Journal of Medicine and Life*. 2011; 4(2): 158-62.
  34. Martineau L., Shek P.N. Peritoneal cytokine concentrations and survival outcome in an experimental bacterial infusion model of peritonitis. *Critical Care Medicine*. 2000; 28(3): 788-94.
  35. Scheingraber S., Bauerfeind F., Böhme J., Dralle H. Limits of peritoneal cytokine measurements during abdominal lavage treatment for intraabdominal sepsis. *American Journal Of Surgery*. 2001; 181(4): 301-08.
  36. Riché F., Gayat E., Collet C., Matéo J., Laisné M.J., Launay J.M., et al. Local and systemic innate immune response to secondary human peritonitis. *Critical Care*. 2013; 17(5): R201. <https://doi.org/10.1186/cc12895>
  37. Tpusova Ju.S., Shapovalov K.G. Changes in microcirculatory hemostasis in patients with peritonitis against the background of arterial hypertension. *Vestnik eksperimental'noy I klinicheskoy khirurgii*. 2012; 5(2): 287-90. (In Russian)
  38. Wykes M., Lewin S. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2018; 18: 91-104. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.112>
  39. Savchenko A.A., Zdzitoveckij D.Je., Borisov A.G. *Immunometabolic disorders in disseminated purulent peritonitis [Immunometabolicheskie narusheniya pri rasprostranennom gnoinom peritonite]*. Novosibirsk: Nauka; 2013. (In Russian)
  40. Yarilin A.A. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (In Russian)
  41. Peters B.M., Noverr M.C. Candida albicans-Staphylococcus aureus polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infection and Immunity*. 2013; 81(6): 2178-89. <https://doi.org/10.1128/IAI.00265-13>
  42. Yung S., Chan T.M. Pathophysiological changes to the peritoneal membrane during PD-related peritonitis: the role of mesothelial cells. *Mediators Of Inflammation*. 2012; 2012: 484167. <https://doi.org/10.1155/2012/484167>.
  43. McCully M.L., Chau T.A., Luke P., Blake P.G., Madrenas J. Characterization of human peritoneal dendritic cell precursors and their involvement in peritonitis. *Clinical And Experimental Immunology*. 2005; 139(3): 513-25.
  44. Kaukonen K.M., Bailey M., Pilcher D. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 372(17): 1629-38.
  45. Davydov Ju.A., Lapichev A.B., Volkov A.V. *General purulent peritonitis [Obshchiy gnoynny peritonit]*. Yaroslavl: Dia-press; 2000. (In Russian)
  46. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology*. 2007; 5(8): 577-82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1710>
  47. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. 2007; 176(2): 231-41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
  48. Bopisov P.N., Belobopodov V.A. Results of treatment of widespread purulent peritonitis. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2009; 1: 93-5. (In Russian)
  49. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*. 2013; 13(12): 862-74.
  50. Nasonov E.L. Immune checkpoint inhibition and autoimmunity: rheumatological problems. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2018; 56(1): 5-9. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-5-9> (In Russian)
  51. Kosinec V.A., Samsonova I.V. Structural changes in internal organs during experimental purulent peritonitis. *Vestnik Vitebskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta*. 2007; 6(4): 39-46. (In Russian)
  52. Zdzitoveckij D.Je., Bopisov P.N. Options for surgical tactics for widespread purulent peritonitis. *Sibirskoe Meditsinskoe Obozrenie*. 2010; 6: 68-72. (In Russian)

**Сведения об авторах:**

**Кузнецов Максим Сергеевич**, аспирант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России, e-mail: kms2009chita@mail.ru;

**Михайличенко Максим Игоревич**, доктор мед. наук, доцент каф. факультетской хирургии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: mimikhailichenko@gmail.com;

**Красильников Антон Александрович**, врач – хирург, отд-ния гнойной хирургической инфекции ГУЗ «Краевая клиническая больница», e-mail: anton.krasilnikov.96@mail.ru

## Хроника

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092 «2024»

### Воспаление как характеристика здоровья и болезни: как найти баланс? (Информация о 16-м Всемирном конгрессе по воспалению (WCI2024))

Представлена краткая информация о 16-м Всемирном конгрессе по воспалению (WCI 2024), который проходил в Квебеке (Канада) с 21 по 24 июля 2024 г. Освещены последние достижения фундаментальной медицины в области воспаления, продемонстрированы результаты оригинальных, трансляционных и клинических исследований, обсуждены практические аспекты применения новых диагностических стратегий и терапевтических подходов. Были представлены новейшие разработки в области фундаментальных, трансляционных и клинических исследований воспаления, включая клеточную биологию, передачу сигналов, генетику, воспалительные/аутоиммунные заболевания, новые биомаркеры и новые терапевтические подходы к воспалительным болезням человека. Описаны направления исследований ведущих научных групп и национальных обществ различных стран по изучению механизмов развития воспалительной патологии.

**Ключевые слова:** воспаление; патогенез; медиаторы

**Для цитирования:** Кубышкин А.В., Захарьян Е.А., Коваленко Е.П. Воспаление как характеристика здоровья и болезни: как найти баланс? (Информация о 16-м Всемирном конгрессе по воспалению (WCI2024)). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(4): 80–84.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.80-84

### Inflammation in health and disease: a balancing act (information about the 16<sup>th</sup> World Congress on Inflammation (WCI2024))

The following provides a summary of the 16<sup>th</sup> World Congress on Inflammation (WCI 2024), which took place in Québec City (Canada) from July 21 to 24, 2024. Presented the achievements of fundamental medicine in the field of inflammation, demonstrated the results of original, translational and clinical studies, discussed practical aspects of the application of new diagnostic strategies and medical therapeutic technologies. Presented main trends and the most promising directions for the development of research in the field of inflammation, including the investigations of new pathogenetic pathways, identification of cellular and molecular mechanisms, target molecules, genetic mechanisms, and new therapeutic strategies. The directions of research by leading scientific groups and national societies of various countries on the find of the mechanisms of inflammatory pathology development are described.

**Keywords:** inflammation; pathogenesis; mediators

**For citation:** Kubyshkin A.V., Zakharyan E.A., Kovalenko E.P. Inflammation in health and disease: A Balancing Act (Information about the 16<sup>th</sup> World Congress on Inflammation (WCI2024)). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2024; 68(4): 80-84. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.04.80-84

С 21 по 24 июля 2024 г. в Квебеке (Канада) проходил 16-й Всемирный конгресс по воспалению (WCI 2024). Конгресс собрал международных лидеров в изучении процессов воспаления, которые представили последние достижения в данной области, полученные как в фундаментальных, так и в клинических исследованиях. В очной форме мероприятие посетили 250 представителей из 23 стран. В ходе конгресса было проведено 6 пленарных лекций и 28 симпозиумов, в т. ч. 116 устных презентаций ведущих исследователей в области воспаления, на которых были освещены наиболее актуальные вопросы, связанные с послед-

ними достижениями, и возможности их использования в клинической практике. Главный тезис форума, вокруг которого строилось обсуждение: «Воспаление как характеристика здоровья и болезни: как найти баланс?» Среди основных обсуждаемых тем на конгрессе были: иммунометаболизм, иммунитет, инфекционные заболевания, легкие, микробиота, воспаление слизистых оболочек, нейровоспаление, боль, таргеты в лечении воспаления и многое другое.

Конгресс был открыт лекцией проф. Maziar Divangahi (Канада) «Механизмы врожденного и приобретенного иммунитета при легочных инфекциях».

В лекции показана роль врожденных регуляторных механизмов и адаптивных изменений легких на протяжении всей последующей жизни. Проф. M. Divangahi напомнил, что легкие являются «порталом», на уровне которого осуществляется защита от инфекционных агентов, токсичных газов и твердых частиц окружающей среды. Долгосрочные последствия постоянного воздействия этих экологических факторов, которые периодически приводят к развитию воспалительных реакций в легких, в конечном итоге реализуются в формировании «легочной памяти». Докладчик обратил внимание, что углубленное изучение этих повторяющихся процессов включения/выключения иммунных механизмов будет иметь решающее значение для разработки новых терапевтических мишеней.

Необходимо отметить пленарную лекцию проф. Paul Kubes (Университет Калгари, Канада), посвященную проблемам иммунофизиологии тканей и паренхиматозных клеток в поддержании гомеостаза. Показаны механизмы нарушения этого сложного процесса, приводящие к развитию воспаления.

Следующая пленарная лекция профессора Charles Serhan (Гарвардская медицинская школа, США) была посвящена проблемам регенерации и заживления ран. На лекции основное внимание было сосредоточено на специализированных прореагирующих медиаторах (SPM) как факторах, активно способствующих разрешению воспаления, регенерации тканей и являющихся компонентами защиты, контролирующими инфекционный процесс посредством специфического воздействия на миграцию лейкоцитов.

В лекции проф. Hiroshi Takayanagi (Токийский университет, Япония) «Остеоиммунология» обсуждались новые концепции остеоиммунного диалога в области нормы и патологии. Известно, что костный и минеральный обмен поддерживается сбалансированным действием остеокластов, остеобластов и остеоцитов, однако нарушается иммунными реакциями при патологических состояниях. Показано, что остеоиммунные взаимодействия не ограничиваются односторонним воздействием иммунной системы на костный метаболизм. Было представлено открытие влияния костных клеток на иммунные регуляции, включая функцию остеопрогениторных клеток в регуляции гемопоэтических стволовых клеток и опосредованной остеобластами супрессии гемопоэтических злокачественных новообразований. Также были описаны динамические взаимодействия между костной тканью и злокачественными новообразованиями внутренних органов.

В пленарной лекции доктора Mauro Teixeira (Федеральный университет Минас-Жерайс, Бразилия)

«Контроль воспаления в лечении инфекций» были представлены основные механизмы выработки противовоспалительных медиаторов при развитии тяжелых инфекций. В эксперименте было показано усиление выраженности воспаления при наличии бактериальных и вирусных инфекций у мышей с дефицитом FPR2 (в отсутствие рецепторов к прореагирующим молекулам). С другой стороны, введение таких молекул, как ангиотензин 1-7 или аннексин-A1 было связано со снижением воспалительной реакции на моделях вирусных (грипп, лихорадка Денге и коронавирус) и бактериальных инфекций. В лекции обсуждались потенциальные механизмы для использования в лечении инфекционных заболеваний.

Следует отметить пленарную лекцию проф. Cormac Taylor (Университетский колледж Дублинского института Конвея, Ирландия) «Гипоксия и воспаление», которая была посвящена взаимодействию воспаления и гипоксии. Показано, что гипоксия является характерной особенностью воспалительного микроокружения, которая регулирует ключевые факторы транскрипции, включая HIF и NF- $\kappa$ B, как в клетках врожденного, так и приобретенного иммунитета, что может влиять на течение воспаления посредством регуляции развития и функционирования иммунных клеток. На лекции представлено, как гипоксия-зависимые пути влияют на иммунитет; обсуждался их потенциал в качестве терапевтических мишеней при воспалительных и инфекционных заболеваниях.

Завершал череду пленарных лекций проф. Harry Sokol (больница Сент-Антуан, Франция) с лекцией «Микробиота и воспаление кишечника», во время которой были представлены современные взгляды на патогенез воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в т.ч. активацию иммунной системы желудочно-кишечного тракта по отношению к кишечной микробиоте у генетически восприимчивых хозяев под влиянием факторов окружающей среды. Было показано, что микробиота желудочно-кишечного тракта человека имеет основополагающее значение для здоровья и находится под влиянием экологических и генетических факторов, а нарушение хрупкого баланса этой сложной экосистемы, называемое дисбактериозом, является причиной многих заболеваний, включая ВЗК. У пациентов с ВЗК изменяется состав кишечной микробиоты, в частности, уменьшается количество противовоспалительных бактерий, таких как *Faecalibacterium prausnitzii*. Помимо этого, описаны пути создания как новых биомаркёров, так и «мишеней» для последующей медикаментозной терапии.

На проведенных симпозиумах обсуждался широкий спектр научных исследований и проблем в различных областях изучения воспаления. Так, на симпозиуме, организованном GREMI (от фр. Groupe de Recherche et d'Etude des Mediateurs de l'Inflammation), французским обществом по изучению воспаления были представлены последние достижения в области стратегий понимания и регулирования воспалительных процессов в легких. Перечень тем включал «Роль CFTR в функциях нейтрофилов при муковисцидозе» (Dr. Véronique Witko-Sarsat, Франция) и «Неонатальный перекрестный анализ альвеолярных макрофагов и нейтрофилов, регулирующих воспаление легких» (Erwan Pernet, Канада). На симпозиуме также обсуждались «Метаболический контроль вирусно-индуцированного воспаления легких» (Mustapha Si-Tahar, Франция) и «Специализированные медиаторы, способствующие рассасыванию при респираторных заболеваниях» (Bruce Levy, США), представляя инновационные подходы к лечению воспалительных заболеваний легких.

Симпозиумы американских ученых были посвящены проблемам патологии легких («Трансляционное разрешение хронического воспаления» и «Динамика врожденной иммунной памяти в норме и патологии», Joe 'Skip' Garcia, США); сердечно-сосудистых заболеваний (Ying Shen, США); mTOR и лизосомального распознавания питательных веществ макрофагами (Babak Razani, США); восстановления врожденного гомеостаза (Liwu Li, США); межнейтрофильной коммуникации (Daniel Irimia, США); транскрипционного перепрограммирования (Hongbo Luo, США) и эффероцитоза макрофагов (Hanrui Zhang, США). На данных сессиях состоялась активная дискуссия о новых концептуальных достижениях, связанных с фундаментальными принципами динамических сигнальных путей воспаления, а также о достижениях в области таргетной молекулярной и клеточной терапии воспалительных заболеваний. В дополнение к фундаментальным принципам, ведущие эксперты в этой области обсудили их трансляционное значение, связанное с инфекцией и воспалением при повреждении и восстановлении органов.

На симпозиуме, организованном компанией Solutex, были представлены последние исследования, посвященные механизмам, связанным с переходом от продукции провоспалительных молекул к восстановлению гомеостаза. В частности, докладчики рассказали об исследованиях, касающихся терапевтического потенциала аннексина A1, липоксина A4 и резолвина D1, воздействующих на рецептор FPR2-ALX и иденти-

фицированных как противовоспалительные эндогенные медиаторы при сахарном диабете, а также их роль в развитии муковисцидоза (Valérie Urbach, Франция); обсудили роль и действие специализированных медиаторов, способствующих рассасыванию (SPM), в физиопатологии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний (Gabrielle Fredman, США), потенциал использования SPM как для профилактики, так и для устранения воспаления при патологии сердечно-сосудистой системы (Xavier Norel, Франция; Catherine Godson, Ирландия).

В ходе симпозиума, организованного бразильским подразделением общества, обсуждались вопросы вовлечения NET у пациентов с COVID-19 (Fernando Cunha, Бразилия), роль тромбовоспаления (Patricia Bozza, Бразилия) и участие инфламмосом в инфекционных процессах (Dario Zamboni, Бразилия).

Наиболее широко на конгрессе было представлено Канадское общество воспаления. На первом симпозиуме были освещены новые мишени для лечения воспаления слизистых оболочек: роль ELA2 – эпителиальной эластазы, в нарушении заживления мышечной ткани при хронических воспалительных заболеваниях кишечника (Céline Deraison, Франция), терапевтические мишени при целиакии (Elena Verdu, Канада), новые подходы к лечению воспалительных процессов слизистой оболочки (Adriano Rossi, Великобритания). Второй симпозиум «Шаги по пути преодоления боли» познакомил аудиторию с путями преодоления боли, начиная с модуляции нейронных катионных каналов в периферических нервных окончаниях как средства контроля боли при артрите (Jason McDougall, Канада; Marzia Malcangio, Великобритания; Daniela Salvemini, США; Isaac Chiu, США).

Большое внимание было уделено изучению взаимосвязи между микробиотой и воспалением. На третьем симпозиуме Канадского общества воспаления «Контроль микробиоты как способ борьбы с воспалением кишечника» были представлены передовые доклады молодых исследователей (Heather Galipeau, Канада; Jean-Paul Motta, Франция; Alberto Caminero, Канада; Camille Danne, Франция) о новой роли микробных протеаз и метаболизме белков при воспалительных заболеваниях кишечника.

На заключительном симпозиуме «Канада-4» были рассмотрены последние данные, связывающие ось мозг-кишечник с хроническим воспалением, исследованы предполагаемые механизмы, лежащие в основе хронических болей в животе, тревоги и депрессии. Участники представили и обсудили данные клинических исследований и доклинических моделей, изучаю-

ших роль различных факторов, таких как стресс (Muriel Lagauche, США), диета (Qasim Aziz, Великобритания) и микробиом (Premysl Bercik, Канада) на иммунную систему гомеостаз и хроническое воспаление кишечника (Christophe Altier, Канада).

Симпозиум, организованный CIHR (от англ. Canadian Institutes of Health Research), был посвящен проблемам терапевтического воздействия на сосудистое воспаление в условиях метаболического стресса (Katey Rayner, Канада); регуляторным НК-клеткам как возможной терапии реакции «Трансплантат против хозяина» и ряда аутоиммунных заболеваний (Kirk Schultz, Канада); воздействию на сосуды головного мозга путем ингибирования растворимой эпоксид-гидролазы (Walter Swardfager, Канада); изучению эндоканнабиноидной системы и состава микробиоты кала у людей с ВИЧ-инфекцией, получающих антиретровирусную терапию, с диагностированным субклиническим заболеванием коронарных артерий (Cristoforo Silvestri, Канада) и балансу Treg/Th17 на поверхности слизистых оболочек при ВИЧ и ВЗК (Lyle McKinnon, Канада).

Симпозиум японских ученых был посвящен изучению воспалительных заболеваний костной системы и кожи (Tetsuya Taga, Япония), иммунной и воспалительной регуляции костных и межорганных взаимодействий (Hiroshi Takayanagi, Япония), визуализации воспалительных реакций эффекторных клеток в костях и коже (Masaru Ishii, Япония), межорганным взаимодействиям при воспалительных заболеваниях кожи (Kenji Kabashima, Япония) и основных иммунологических путей развития системных аутоиммунных заболеваний, выявленные с помощью функционального анализа генома (Keishi Fujio, Япония).

На симпозиуме, организованном Итальянским фармакологическим обществом (SIF) «Микроглия как новая мишень для терапевтического подхода к нейровоспалительным заболеваниям головного мозга», были представлены открытия в области нейровоспаления (Emanuela Esposito; Livio Luongo; Caterina Scuderi; Elena Marcello).

Во время симпозиума австралийского общества воспаления «Иммунорегуляция при воспалительных заболеваниях» были представлены данные о метаболических особенностях тканей слизистой оболочки при воспалительных заболеваниях (Gabrielle Belz, Австралия); влиянии клонального кроветворения на обмен веществ (Andrew Murphy, Австралия); врожденной иммунной сигнальной оси, которая контролирует выработку воспалительных цитокинов посредством регулируемого иммунорегуляторного (Matt Sweet, Австралия) и роли окисленного холестерина в прогрессиру-

вании воспалительных процессов в легких (Katharina Ronacher, Австралия).

«Российское национальное научное общество воспаления» (ННОВ; <https://nnov.inflammation.ru>, президент – член-корреспондент РАН К.А. Зыков) представляли ученые Крымского федерального университета: директор Инжинирингового центра «Генетические и клеточные биотехнологии», заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии проф. А.В. Кубышкин, доцент кафедры внутренней медицины №1 Е.А. Захарьян и доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии Е.П. Коваленко. Данными учеными на конгрессе было представлено два устных доклада, посвященных изучению роли нейтрофильных протеиназ в развитии местного и системного воспаления (А. Кубышкин) и сывороточных концентраций эндокана и маркеров апоптоза у пациентов с ишемической болезнью сердца в зависимости от выраженности атеросклеротического поражения коронарных артерий (Е. Захарьян, А. Кубышкин).

Также стоит отметить ряд крайне интересных коротких докладов в разделах: «Легкие», «NETs», «Стимулирование разрешения воспаления», «Системное воспаление», «Иммунорегуляция», «Окислительно-восстановительные процессы», «Воспаление и нарушения опорно-двигательного аппарата», «SPMs», «Фагоциты», «COVID-19» и др., в которых были представлены исследования ученых из Японии, Канады, США, Франции, Израиля, Бразилии, Великобритании, Италии, Египта, Швеции.

Помимо симпозиумов, на конгрессе было представлено более 90 постерных докладов. Основные материалы конгресса и тезисы докладов опубликованы в сборнике конгресса [1].

Отдельное заседание было посвящено памяти проф. Pierre Vorgeat (1947-2013), выдающемуся ученому и наставнику, который провел большую часть своей карьеры в Квебеке и внес значительный вклад в открытие лейкотриенов. Исторический обзор его научного пути был исчерпывающе представлен проф. Charles Serhan в присутствии семьи, друзей и бывших коллег.

Особо следует отметить блестящие выступления проф. Giuseppe Cirino (Италия), удостоенного премии «За достижения в науке», и Patricia Bozza (Бразилия), удостоенной премии «Женщины в науке». Оба докладчика рассказали о своем пути в науке и привели интересные факты их научной биографии. Оргкомитет также вручил премии за лучшие устные презентации и постерные доклады. Премии «Молодой исследователь» была удостоена Camille Danne (Франция); премией «Awards Travel» была награждена Dominika

Drab (Польша); премиями за лучший устный доклад были удостоены Andréa Murru (Канада), Amber Hann (Канада), Marilena Christoforou (США), Robert Nshimiyimana (США); премии за лучший стендовый доклад получили Sarah-Maude Goulet (Канада), Jade Gauvin (Канада), Emeka Okeke (США), Nichem Badji (Франция).

В рамках конгресса состоялась встреча представителей национальных обществ по изучению воспаления, в которой приняли участие представители национальных обществ Канады, США, Италии, Франции, Японии, Бразилии, Австралии и России. Нашу

страну на заседании представлял проф. А.В. Кубышкин. Обсуждались такие актуальные вопросы, как дальнейшее развитие общества, привлечение спонсоров, новых членов и ряд других организационных вопросов. Приняты ряд решений по дальнейшему развитию международной кооперации, обмена знаниями и профессиональными компетенциями в изучении проблемы воспаления. Решено следующий 17-й Всемирный конгресс по воспалению провести в 2026 г. в г. Игуасу (Бразилия), а проведение 18-го конгресса предварительно запланировано на 2028 г. в г. Киото (Япония).

*Доктор мед. наук, проф.,  
директор Инжинирингового центра  
«Генетические и клеточные биотехнологии»,  
зав. каф. общей и клинической патофизиологии*  
**А.В. Кубышкин**  
*канд. мед. наук,  
доцент каф. внутренней медицины № 1*  
**Е.А. Захарьян**  
*канд. мед. наук,  
доцент каф. акушерства, гинекологии  
и перинатологии*  
**Е.П. Коваленко**

## Юбилей

УДК 612.017.1:92 Черешнев

### К 80-летию со дня рождения Валерия Александровича Черешнева Dedicated to the 80<sup>th</sup> Anniversary of Valery Alexandrovich Chereshev



Валерий Александрович Черешнев родился в октябре 1944 г. в Хабаровске в семье военного офицера и врача. С самого детства он интересовался медициной, посещая лекции в Хабаровском медицинском институте вместе со своей матерью, тогда еще студенткой Ириной Сергеевной. Педагоги вспоминали, что мальчик всегда внимательно слушал лекции и никогда не беспокоил окружающих. Валерий Александрович шутливо отмечает, что это, вероятно, определило его будущую профессиональную деятельность, так как он усваивал первые знания медицины «с молоком матери».

Отец Валерия Черешнева, Александр Федорович, участник Великой Отечественной войны, получил серьезное ранение на фронте и был награжден шестью боевыми наградами, включая два ордена Красной звезды. После войны он остался служить в МВД. Черешнев-старший был страстным любителем литературы, у них дома была обширная библиотека с произведениями таких авторов, как Достоевский, Пушкин, Стендаль и Мопассан. В 1960 г., в возрасте 43 лет, Александр Федорович Черешнев скончался от рака желудка. После того как неизлечимая болезнь отняла жизнь у отца, Валерий Александрович Черешнев решил посвятить свою жизнь

изучению причин возникновения онкологических заболеваний.

В 1968 г. Валерий Александрович окончил с отличием Пермский государственный медицинский институт по специальности лечебное дело и был оставлен в аспирантуре. В 1970 г. досрочно защитил кандидатскую диссертацию, научным руководителем которой был профессор Р.Б. Цынкаловский. В 1982 г. защитил докторскую диссертацию на тему «Закрытая травма груди в комбинации с гамма-облучением (клиника, патогенез, лечение, медицинская защита)». С 1970 по 1974 гг. работал ассистентом, 2 года (1974-1976 гг.) — старшим преподавателем кафедры Пермского государственного педагогического института по курсу физиологии, а затем вновь по 1988 г. — доцентом, профессором кафедры патологической физиологии ПГМИ. Одновременно с 1976 по 1984 гг. заведовал проблемной научной лабораторией, а с 1984 г. — Центральной научно-исследовательской лабораторией Пермского медицинского института.

В 1988 г. избран по конкурсу на должность директора Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, созданного на базе одноименного отдела; в 1999 г. организовал в Екатеринбурге филиал ИЭГМ УрО РАН, который в январе 2003 г. был преобразован в Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, который Валерий Александрович Черешнев и возглавил.

В 1990 году Валерий Александрович избран членом-корреспондентом, в 1997 г. академиком РАН. В 1999 г. избран Председателем УрО РАН и вице-президентом РАН; в 2001 г. переизбран Председателем УрО РАН.

Интерес к исследовательской деятельности, научному эксперименту проявился у Валерия Александровича еще в студенчестве. С четвертого курса он был старостой кружка на кафедре патофизиологии, занимался экспериментальными работами, в результате на третьем курсе обучения в аспирантуре, в 1970 г., защитил досрочно кандидатскую диссертацию на тему «О роли свойств микробной клетки и макроорганизма в механизме развития ранней фагоцитарной реакции на введение брюшнотифозной вакцины», научным руководителем которой был крупный ученый, заведующий кафедрой патофизиологии, профессор Ростислав Борисович Цынкаловский. Впечатляет, на-

скольким широк диапазон творческих и научных интересов Валерия Александровича. Он – выдающийся специалист в области экспериментальной и клинической иммунологии, иммунофизиологии, радиационной иммунологии, патофизиологии экстремальных состояний, социально-демографической безопасности и здоровья нации. Основные направления научной деятельности – экология и иммунитет, иммунофизиология, иммунные механизмы воспаления, стресса, сердечно-сосудистой патологии, опухолей, глазных болезней, СПИД.

В рамках разрабатываемой теории адаптации иммунной системы к экстремальным факторам представлен целый спектр оригинальных научных концепций и фундаментально-теоретических положений, на основе которых в практическую медицину внедрен ряд инновационных технологий. Им создана концепция системного воспаления как типового патологического процесса, обоснована роль экологической цепи «макроорганизм – бактерии – вирусы» в патогенезе соматических заболеваний. И это далеко не полный перечень направлений научной деятельности Валерия Александровича.

В процессе преподавания патологической физиологии активно используются материалы его монографий, статей, научных докладов.

А учебник В.А. Черешнева в соавторстве с Б.Г. Юшковым «Патофизиология» – настольная книга студентов при изучении предмета.

Валерием Александровичем опубликовано более 400 научных работ, среди них – 28 монографий, 2 книги, 2 учебника для вузов, 3 руководства по изучению комбинированных радиационных поражений, 8 учебных пособий. Он автор 2-х открытий и 29-ти изобретений.

Валерий Александрович Черешнев организовал и возглавил три кафедры иммунологии в вузах Перми и Екатеринбурга. Под его руководством защитились 22 кандидата и 37 докторов наук.

На протяжении многих лет академик Черешнев является Председателем Экспертного совета ВАК по биологическим наукам, он возглавляет секцию экологической политики Научно-экспертного совета при Председателе Совета Федерации Федерального собрания РФ, является членом Научно-экспертного совета при Председателе Совета Федерации Федерального Собрания РФ. Валерий Александрович – Президент Российского Научного общества иммунологов, председатель Уральского общества иммунологов, член Совета Российского фонда фундаментальных исследований. Академик В.А. Черешнев – главный редактор «Российского иммунологического журнала», «Вестника

Уральской медицинской академической науки», Вестника УрО РАН «Наука. Общество. Человек», «Иммунология Урала».

Вклад Валерия Александровича Черешнева в отечественную науку и его общественная деятельность отмечены высокими государственными и научными наградами. Среди них орден Дружбы, орден «За заслуги перед Отечеством» IV степени, медаль «За трудовое отличие». Ему присуждены: премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники, Строгановская премия за выдающиеся заслуги в науке и технике, Национальная российская экологическая премия «Экомир» и другие. Нельзя не отметить неоценимую поддержку супруги Валерия Александровича Маргариты Владимировны, вместе они прошли 40 лет жизни, начиная с медицинского института и заканчивая руководством отделения Российской академии наук.

В 2007 г. профессор Черешнев избирается депутатом Государственной Думы Федерального Собрания Российской Федерации и становится председателем Комитета Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям.

Кроме своей выдающейся медицинской, научной и преподавательской карьеры Валерий Александрович интересуется жизнью во многих ее проявлениях: любит поэзию, знает наизусть большое количество стихов (любой, кто слушал лекции и доклады Валерия Александровича, мог в этом убедиться), тонкий ценитель живописи, блестящий знаток русской истории. Особая ценность научных достижений Валерия Александровича, его взглядов на развитие общества, науки, является реализуемый им принцип историзма как диалектического метода познания. Это прослеживается в его трудах, докладах, лекциях. На одном из своих выступлений Валерий Александрович сказал: «Любовь к истории неотделима от каждого из нас. Именно она влечёт нас в будущее и возвращает к прошлому, поэтому мы уверены: события, волнующие нас, будут интересовать и потомков...».

Валерий Александрович Черешнев является выдающимся представителем современной российской науки. Его широкие познания в медицине, биологии и биохимии позволяют ему успешно руководить научными исследованиями и иметь множество учеников. Он активно сотрудничает с учеными из Перми по различным проблемам педиатрии, иммунологии и аллергологии. Его научная деятельность отличается целеустремленностью и упорством, что позволяет ему достигать высоких результатов.

*Поздравляем Валерия Александровича с юбилеем и желаем ему новых творческих успехов во благо отечественной науки и медицинской практики!*

*Коллеги Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е.А. Вагнера*