

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:
ФГБНУ «НИИОПП»,
125315, Москва, ул. Балтийская, 8,
E-mail: niiorpp@mail.ru

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

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

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

Формат издания: 205×265 мм
Печать: цифровая
Тираж 100 экз.

Осуществляется также адресная
рассылка электронной версии журнала
профильным организациям в стране
и за рубежом

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

Сдано в набор 28.02.2025
Подписано к печати 15.03.2025
Опубликовано 27.03.2025

Отпечатано: ООО «Мегаполис-Принт»
Адрес типографии:
125315, г. Москва, Ленинградский
проспект, д 78, корп.1

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»,
2025.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и Экспер. тер.
2025. Том 69. № 1, 1-116.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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 69 № 1 · 2025

Январь–Март

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, Хигасиосака, Япония*
Г.В. Порядин, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «РНИМУ 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., ФГБУН «НИИФ УрО» РАН, Екатеринбург*
М.Ю. Яковлев, *д.м.н., проф., ФГБНУ «НИИОПП», Москва*
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 ПДО», Барнаул*
В.П. Михайлов, *д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Ярославский ГМУ», Ярославль*
Д.Б. Никитюк, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва*
В.Г. Овсянников, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*
М.В. Осиков, *д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «ЮУГМУ», Челябинск*
Д.А. Сычев, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБОУ ДПО «РМАНПО», 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, Infor-
mation Technology and Mass
Communications - registration number PI
No. FS77-84858 dated 21.03.2023

Mailing address:
Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315,
Russian Federation,
FSBSI «IGPP», Room 379

E-mail: path.physiol@yandex.ru
Home page: www.pfiel.ru

Publisher:
FSBSI «IGPP», Baltiyskaya str., 8, Moscow,
125315, Russian Federation
E-mail: niiopp@mail.ru

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

Two-year impact factor
according to RSCI on 2023 was 0,560

Subscription Index in «Ural Press»:
71456

Publication format: 205 × 265 mm
Printing: Digital Circulation: 100 copies

The electronic version of the journal is
also sent to specialized organizations in
the country and abroad

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

Sent into set on 28.02.2025
Signed for publication on 15.03.2025
Published on 27.03.2025

Printed: LLC «Megapolis-Print»
Printing house address:
Leningradsky Prospekt, 78, bild. 1,
125315, Moscow, Russian Federation

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

©Federal State Budgetary Scientific
Institution «Institute of General Pathology
and Pathophysiology», 2025.

ISSN 0031-2991
Pat Fiziol Eksp Ter
2025. Vol. 69. No 1. 1–116.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Federal State Budgetary Scientific 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. 69 № 1 · 2025

January–March

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

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

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

R. Mallet, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

O. Matsuo, *PhD, Prof., Kindai University, Higashiosaka, Japan*

G.V. Poryadin, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., «Pirogov National Research Med. Univ.», Moscow, Russia*

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

O.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*

M.Yu. Yakovlev, *MD, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 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. Shabalina, *acad. RAS, MD, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Селезнева Ан.Д., Иванова Н.А., Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Казубская Т.П., Бурдённый А.М., Брага Э.А., Логинов В.И.** Аберрантное метилирование и экспрессия белок-кодирующих генов системы деметилирования и генов длинных некодирующих РНК при светлоклеточном раке почки 4
- Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Деморжи М.С., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Онищенко Н.А., Никольская А.О., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Проценко А.Н., Нестеренко М.В., Басок Ю.Б.** Изменения метаболизма и состояния клеток системы крови и костного мозга при курсовом применении Лактоферрина на различных этапах развития сахарного диабета 2 типа 14
- Пукаева Н.Е., Кухарская О.А., Иванова Т.В., Наздрачева М.Р., Бурак М.В., Попов А.А., Овчинников Р.К., Антохин А.И., Московцев А.А., Кухарский М.С.** Агрегация мутантной формы белка альфа-синуклеина α -Syn A53T в клетках нейронального типа SH-SY5Y: валидация модели 29
- Галимова Э.Ф., Громенко И.Д., Галимов Ш.Н., Гилязова И.Р., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Ткаченко С.В., Литвицкий П.Ф.** Экзосомальные микроРНК в патогенезе идиопатического мужского бесплодия 42
- Кузеванова А.Ю., Апанович Н.В., Халмурзаев О.А., Макарова Д.М., Апанович П.В., Матвеев В.Б., Логинов В.И., Алимов А.А.** Ингибирование экспрессии гена *LGALS9* активирует Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность в опухоли почки 49
- Шарикадзе Д.Т., Габитов М.В., Лобанов А.В., Гребенчиков О.А., Кузовлев А.Н.** Изучение влияния хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов после черепно-мозговой травмы 58
- Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А.** Коагулянтные эффекты композитов хитозана с аминокислотами (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистеин) *in vitro* 65
- Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Базарный В.В.** Содержание продуктов гликоксидации в ротовой жидкости коррелирует с возрастом 73

ОБЗОРЫ

- Даренская М.А., Гончаров И.С., Колесников С.И., Семенова Н.В., Колесникова Л.И.** Пародонтит и окислительный стресс: современные тенденции в изучении патогенетической взаимосвязи и способы коррекции 81
- Будаева М.В., Мелерзанов А.В.** Роль сахарозаменителей в диабетическом питании и персонализированном управлении заболеванием: Молекулярные и генетические механизмы 92
- Евдокимова Н.В., Черненко Т.В.** Микробный метаболом кишечника: современные данные и перспективы практического применения 102
- Макеев Н.В., Миронов И.В., Антонов М.А., Руденко Д.С.** Клиническая эффективность полипептидного препарата Кортексин в терапии дисциркуляторных и посттравматических нарушений 111

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Selezneva An.D., Ivanova N.A., Selezneva Al.D., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Burdenyy A.M., Braga E.A., Loginov V.I.** Aberrant methylation and expression of protein-coding genes of the demethylation system and long non-coding RNA genes in clear cell renal cell carcinoma 4
- Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Demorzhi M.S., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Onishchenko N.A., Nikolskaya A.O., Stepanova O.I., Klyosov R.A., Semenov Kh.Kh., Protzenko A.N., Nesterenko M.W., Basok Yu.B.** Changes in the metabolism and state of blood and bone marrow cells during a course of Lactoferrin treatment at various stages of the development of type 2 diabetes mellitus 14
- Pukaeva N.E., Kukharskaya O.A., Ivanova T.V., Nazdracheva M.R., Burak M.V., Popov A.A., Ovchinnikov R.K., Antokhin A.I., Moskovtsev A.A., Kukharsky M.S.** Aggregation of the mutant alpha-synuclein protein (α -Syn A53T) in SH-SY5Y neuronal cells: model validation 29
- Galimova E.F., Gromenko I.D., Galimov Sh.N., Gilyazova I.R., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Tkachenko S.V., Litvitskiy P.F.** Exosomal microRNAs in the pathogenesis in idiopathic male infertility 42
- Kuzevanova A.Yu., Apanovich N.V., Khalmurzaev O.A., Makarova D.M., Apanovich P.V., Matveev V.B., Loginov V.I., Alimov A.A.** Inhibition of *LGALS9* gene expression activates T cell-mediated cytotoxicity in renal tumor 49
- Sharikadze D.T., Gabitov M.V., Lobanov A.V., Grebenchikov O.A., Kuzovlev A.N.** The effect of lithium chloride on the level of pro-inflammatory cytokines after traumatic brain injury 58
- Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E., Shubina T.A.** Coagulant effects of chitosan composites with amino acids (aspartic acid, glutamic acid, cysteine) *in vitro* 65
- Kopenkin M.A., Polushina L.G., Bazarnyi V.V.** Concentrations of glycoxidation products in mixed saliva correlates with age 73

REVIEWS

- Darenskaya M.A., Goncharov I.S., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Kolesnikova L.I.** Periodontitis and oxidative stress: Current trends in the study of pathogenetic relationships and methods of correction 81
- Budaeva M.V., Melerzanov A.V.** The role of sugar substitutes in the nutrition and personalized management of patients with type 2 diabetes mellitus or prediabetic conditions: Molecular and genetic mechanisms 92
- Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V.** Microbial metabolome of the intestine: Current data and prospects for practical application 102
- Makeev N.V., Mironov I.V., Antonov M.A., Rudenko D.S.** Clinical efficacy of the polypeptide drug Cortexin in the treatment of circulatory and post-traumatic disorders 111

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2025

УДК 575:599.9

Селезнева Ан.Д.¹, Иванова Н.А.¹, Селезнева Ал.Д.¹, Лукина С.С.¹, Казубская Т.П.², Бурдённый А.М.^{1,3}, Брага Э.А.¹, Логинов В.И.¹

Аберрантное метилирование и экспрессия белок-кодирующих генов системы деметилирования и генов длинных некодирующих РНК при светлоклеточном раке почки

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115522, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

³ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, 119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4

Предпосылки. Ключевую роль в развитии и прогрессии опухолей играют эпигенетические изменения. В частности, результаты многочисленных исследований однозначно подтверждают вовлеченность в онкогенез аномального метилирования ДНК в промоторных CpG-островках ряда белок-кодирующих генов (БКГ), генов микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК). Результатом аномального метилирования ДНК может стать ингибирование транскрипции генов-супрессоров, обеспечивающих в нормальных клетках защиту от злокачественной трансформации. Одной из причин, которая приводит к аномальному метилированию ДНК, может быть нарушение в работе генов семейства диоксигеназ TET. **Целью** настоящей работы является исследование роли изменений уровня метилирования и экспрессии белок-кодирующих генов *TET1*, *TET2* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в патогенезе светлоклеточного рака почки.

Методика. В работе использовали парные образцы операционного материала (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань) от 47 пациентов с диагнозом «светлоклеточный рак почки», которые были собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Уровень метилирования анализировали с помощью количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени. 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. Для исследования влияния метилирования исследуемых генов на их экспрессию, а также анализа коэкспрессии и кометилирования БКГ и генов днРНК рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Все статистические расчеты проводили в программе IBM SPSS Statistics 29. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Впервые показано статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и *GAS5* в ткани опухоли больших скПРК по сравнению с нормальной тканью. Для генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и *GAS5* также зафиксировано статистически значимое снижение уровня их экспрессии в опухолевых образцах, тогда как для гена *TET2* отмечено увеличение уровня экспрессии в опухолевой ткани. Выявлены значимые ассоциации статуса метилирования генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* со стадией заболевания и наличием метастазов в лимфатические узлы, а *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* – с размером первичной опухоли. Кроме того, обнаружено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *ADAMTS9-AS2* на более поздних (III–IV) стадиях заболевания, а гена *SNHG6* – при увеличении размера новообразования. Показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением статуса метилирования промоторных CpG-островков генов *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* и изменением уровня их экспрессии. Выявлена достоверная корреляция между уровнями метилирования промоторных областей для трех пар генов «днРНК–БКГ» (*ADAMTS9-AS2* / *SNHG6* – *TET1*, *GAS5* – *TET2*) и между уровнями экспрессии для двух пар генов «днРНК–мРНК» (*GAS5* – *TET1*, *SNHG6* – *TET2*).

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о вовлеченности аберрантного метилирования в возникновение и прогрессию светлоклеточного рака почки, а также указывают на потенциальную применимость выявленных закономерностей в прогнозировании и диагностике данного заболевания.

Ключевые слова: метилирование; экспрессия генов; TET-белки; длинные некодирующие РНК; светлоклеточный рак почки

Для цитирования: Селезнева Ан.Д., Иванова Н.А., Селезнева Ал.Д., Лукина С.С., Казубская Т.П., Бурдённый А.М., Брага Э.А., Логинов В.И. Аберрантное метилирование и экспрессия белок-кодирующих генов системы деметилирования и генов длинных некодирующих РНК при светлоклеточном раке почки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 4–13.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.4-13

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

Для корреспонденции: *Бурденный Алексей Михайлович*, e-mail: burdenny@gmail.com;
Логинов Виталий Игоревич, e-mail: loginov7w@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств Государственного задания, №. FG FU-2025-0010.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.01.2025

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Selezneva An.D.¹, Ivanova N.A.¹, Selezneva Al.D.¹, Lukina S.S.¹, Kazubskaya T.P.², Burdenny A.M.^{1,3}, Braga E.A.¹, Loginov V.I.¹

Aberrant methylation and expression of protein-coding genes of the demethylation system and long non-coding RNA genes in clear cell renal cell carcinoma

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

²Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 23 Kashirskoe highway, Moscow, 115522, Russian Federation;

³Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina str., Moscow, 119334, Russian Federation

Background. Epigenetic changes play a key role in tumor emergence and progression. Specifically, multiple studies have unequivocally reported the involvement in oncogenesis of abnormal DNA methylation in the promoter CpG islands of a number of protein-coding genes, miRNA genes, and long non-coding RNA (lncRNA) genes. Abnormal DNA methylation can result in the inhibition of the transcription of suppressor genes that normally protect cells from malignant transformation. One cause for the abnormal DNA methylation may be disordered functioning of the TET family dioxygenase genes. **Objective.** The aim of this study was to investigate the role of changes in the levels of methylation and expression of *TET1*, *TET2* protein-coding genes and *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* lncRNA genes in the pathogenesis of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).

Methods. Paired samples of surgical material (tumor/adjacent histologically normal tissue) from 47 patients diagnosed with ccRCC were used in the study. The samples were collected and clinically characterized at the Research Institute of Clinical Oncology of the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Methylation levels were analyzed by quantitative methyl-specific real-time PCR. The expression level was assessed by reverse transcription reaction followed by cDNA amplification using SYBR Green real-time PCR. Significance of differences between the studied groups was analyzed with the non-parametric Mann-Whitney test for independent samples. The effect of gene methylation on their expression and the co-expression and co-methylation of protein-coding genes and lncRNA genes were analyzed using the Spearman's correlation coefficient. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS Statistics 29 software. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results. For the first time, this study showed a significant increase in the methylation levels of *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, and *GAS5* genes in tumor tissue from ccRCC patients compared to normal tissue. Also, the *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, and *GAS5* genes demonstrated significant decreases in their expression level in tumor samples, while the *TET2* gene expression level was increased in tumor tissue. Significant correlations of the methylation status of *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes with the disease stage and the presence of lymph node metastases were found, and *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, and *SNHG6* methylation correlated with the primary tumor size. In addition, the expression level of the *ADAMTS9-AS2* gene was significantly decreased in advanced (III-IV) stages of the disease, and the expression level of the *SNHG6* gene with an increase in tumor size. A statistically significant negative correlation was observed between changes in the methylation status of promoter CpG islands of the *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes and changes in their expression level. A significant correlation was found between the methylation levels of promoter regions in three "lncRNA-protein-coding gene" pairs (*ADAMTS9-AS2* / *SNHG6* – *TET1*, *GAS5* – *TET2*) and between expression levels in two "lncRNA-protein-coding gene" pairs (*GAS5* – *TET1*, *SNHG6* – *TET2*).

Conclusion. The study demonstrated the involvement of aberrant methylation in the emergence and progression of clear cell renal cell carcinoma, and also suggested the applicability of the identified patterns in the prognosis and diagnosis of this disease.

Keywords: methylation; gene expression; TET proteins; long non-coding RNA; clear cell renal cell carcinoma

For citation: Selezneva An.D., Ivanova N.A., Selezneva Al.D., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Burdenny A.M., Braga E.A., Loginov V.I. Aberrant methylation and expression of protein-coding genes of the demethylation system and long non-coding RNA genes in clear cell renal cell carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 4–13. (In Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.4-13

Author's contribution: material processing, conducting research – Selezneva An.D., Selezneva Al.D., Ivanova N.A.; statistical processing of results, writing the text – Selezneva An.D.; Lukina S.S.; collection and description of material – 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 – all co-authors.

For correspondence: **Alexey M. Burdenny**, PhD in Biology, leading researcher, laboratory of pathogenomics and transcriptomics, e-mail: burdenny@gmail.com; **Vitaly I. Loginov**, PhD in Biology, leading researcher, laboratory of pathogenomics and transcriptomics, e-mail: loginov7w@gmail.com

Information about the authors:

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

Selezneva Al.D., <https://orcid.org/0009-0001-5472-8879>

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

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-2025-0010.

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

Received 15.01.2025

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

На сегодняшний день онкологические заболевания остаются глобальной проблемой общественного здравоохранения. Данное утверждение справедливо и в отношении рака почки. Так, согласно наиболее свежему отчету IARC (International Agency for Research on Cancer), в 2022 г. этот диагноз был поставлен более 434 тыс. человек во всем мире (2,2% от общего числа случаев), около 156 тыс. пациентов в результате болезни скончались (1,6% от общего числа случаев) [1]. Наиболее распространенным подтипом указанной онкопатологии является светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР). Поскольку на ранних стадиях заболевание не сопровождается специфическими симптомами, около трети пациентов на момент постановки диагноза уже имеет отдаленные метастазы. Примерно такая же доля приходится на больных, столкнувшихся с рецидивом после полной резекции первичной опухоли. Стоит отметить, что проблема усугубляется значительной неэффективностью традиционных подходов к лечению – лучевой терапии и химиотерапии [2]. Вышесказанное подчеркивает необходимость идентификации новых биомаркеров, применимых для ранней диагностики, прогнозирования течения заболевания и выбора терапевтической стратегии. Особого внимания в данном контексте заслуживают гены, подверженные aberrантному метилированию при раке.

Метилирование ДНК является одним из ключевых эпигенетических механизмов, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов и обеспечение ее клеточной специфичности. Дерегуляция данного процесса является характерным признаком раковых клеток и может приводить к нарушению нормального паттер-

на метилирования промоторных областей различных групп генов, как белок-кодирующих, так и регуляторных. Следует отметить, что сегодня значительный интерес вызывает изучение эпигенетического статуса генов, продукты которых являются непосредственными регуляторами динамических изменений метилирования ДНК. В рамках настоящей работы выбор был остановлен на представителях семейства TET (ten-eleven translocation) – TET1 и TET2, играющих центральную роль в осуществлении активного деметилирования ДНК путем поэтапного окисления 5-метилцитозина. Согласно результатам ряда исследований, при различных видах рака гены этих диоксигеназ могут демонстрировать недостаточную или, напротив, избыточную экспрессию, притом нередко обусловленную эпигенетическими событиями [3].

Предметом нарастающего интереса современных исследований в области онкологии также являются длинные некодирующие РНК (днРНК), объединяющие набор транскриптов, не кодирующих белки и имеющих длину более 200 нуклеотидов. Способность представителей данного класса молекул функционировать в качестве регуляторов генной экспрессии на эпигенетическом, транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях определяет их вовлеченность в разнообразные клеточные процессы, включая апоптоз, дифференцировку и пролиферацию клеток [4, 5]. В свою очередь нарушение их экспрессии ведет к широкомасштабным изменениям в клеточной регуляции и может способствовать онкогенезу. Стоит отметить, что к настоящему времени обнаружено немало генов днРНК, aberrантное метилирование которых ассоциировано с развитием и прогрессией злокачественных новообразований.

Наряду с БКГ они обладают потенциалом для использования в качестве диагностических и прогностических биомаркеров при различных типах рака.

Целью работы является исследование роли изменений уровня метилирования и экспрессии белок-кодирующих генов *TET1*, *TET2* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в патогенезе светлоклеточного рака почки.

Методика

Материалом для исследования послужили парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань почки) образцы операционного материала от 47 пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В отделе патоморфологии опухолей данного исследовательского центра все опухоли были морфологически охарактеризованы на основании критериев классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [6]. Клинико-морфологические характеристики образцов скПКР представлены в **таблице 1**.

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288) и с разрешения локального этического комитета института ФГБНУ «Научно-исследовательский институт 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. Забор ткани производили только у больных, не получавших до операции лучевую, гормональную или химиотерапию. Полученный биологический материал помещали в жидкий азот и хранили при -70°C . Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике фенол-хлороформной очистки, суммарную РНК – с помощью метода гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия). Оценку качества и концентрации нуклеиновых кислот осуществляли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США).

С целью анализа уровня метилирования генов проводили бисульфитную конверсию ДНК, с последующей количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ), как сообщалось ранее [7]. Амплификацию осуществляли в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с протоколом, прилагаемым к прибору, с использованием набора qPCRMix-HS

SYBR согласно протоколу производителя («Евроген», Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров и условия проведения ПЦР для контрольного гена *ACTB* и генов *SNHG6*, *GAS5* были заимствованы из работ [8-10], а для генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, представлены в **таблице 2**.

В качестве контролей для неметилованных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 («Promega», США). В качестве положительного контроля 100%-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 («Thermo Fisher Scientific»).

Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов выделенная из 20 парных биологических образцов РНК была использована для проведения реакции обратной транскрипции с помощью набора реактивов MMLV RT kit # SK021 (Евроген, Россия). Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы при проведении SYBR Green ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при помощи набора qPCRMix-HS SYBR в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System («Bio-Rad», США). Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР для контрольного гена *B2M*, а также генов *TET1*, *TET2*, *SNHG6*, *GAS5* были заимствованы из работ [9-12], а для гена *ADAMTS9-AS2* представлены в **таблице 2**. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК.

Результаты ПЦР в реальном времени были проанализированы по методу определения величины C_T [13]. Все реакции ПЦР повторяли трижды.

Таблица 1/Table 1

Клинико-морфологические параметры образцов скПКР Clinical and morphological characteristics of patients samples with ccRCC

Клинико-морфологический параметр	n=47 (%)	
Стадия опухолевого процесса	I	21 (44,68 %)
	II	9 (19,15%)
	III	12 (25,53%)
	IV	5 (10,64%)
Размер первичной опухоли	T1	21 (44,68)
	T2	9 (19,15%)
	T3	15 (31,91)
	T4	2 (4,26)
Лимфогенное метастазирование	N0	39 (82,98)
	N1-3	8 (17,02)

Таблица 2/Table 2

Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры количественной ПЦР в реальном времени

Sequences of oligonucleotides and qPCR-RT characteristics

Название гена	Последовательность праймера	T _{отж.} , °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
Анализ уровня метилирования (МС-ПЦР-РВ)			
TET1	MF: TTGTTTCGGCGTCGTTTGTGC MR: AACGCCTACCGACTCCCAACACA	61	184
	UF: TTTTGAGGTTTGTTTTGGGGAGATAT UR: AAAATCAATCCCAAAAATCCACAAT	57	205
TET2	MF: GGTTTTTATTGCGCGTTTCGTTGTAC MR: CAAACTCTCGCCGCTACACTACC	60	217
	UF: GGTGTGAGGGTAGTTTAGGTTTTATTG UR: CACTACCACTACCACTACCACTACTCT	57	223
ADAMTS9-AS2	MF: AATTTTCGATAGCGTATTTCCGGGAGTTAC MR: TCTTAAAATCCCAACACATCCTTCCT	59	187
	UF: TTTTGATAGTGTATTTTGGGAGTTATGG UR: AATACTCACCCCAACACTAAACTACT	56	238
Анализ уровня экспрессии			
ADAMTS9-AS2	F: CTCCACCCGATCCTTCCATTGA R: GGGGGTCTTGCTCTTTCCTTATCC	57.9	199

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 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> database and the <https://www.urogene.org/methprimer2/> program 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, включая определение медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей, а также построение диаграмм размаха проводили при помощи программы Microsoft Excel 365 и с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 29.0.2.0. Для оценки достоверности различий уровней метилирования и экспрессии исследуемых генов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для исследования влияния метилирования анализируемых 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 ≤ 0.05.

Результаты

Отбор генов днРНК и белок-кодирующих генов системы деметилирования, потенциально ассоциированных с возникновением и прогрессией скПКР, был выполнен на основании анализа данных литературы и интернет-источников с учетом следующих критериев: (1) наличие CpG-островка в области не далее 2000 п.н. от 5'-конца гена днРНК или 5'-конца БКГ; (2) наличие данных об изменении уровня мети-

лирования гена в эпителиальных опухолях каких-либо локализаций. В итоге были выбраны 2 белок-кодирующих гена (TET1 и TET2) и 3 гена днРНК (ADAMTS9-AS2, SNHG6, GAS5).

В результате анализа данных с применением критерия Манна–Уитни нами было показано статистически значимое увеличение уровня метилирование генов TET1, ADAMTS9-AS2, SNHG6 и GAS5 в ткани опухоли больных скПКР по сравнению с нормальной тканью (табл. 3). Стоит отметить, что гиперметилирование вышеупомянутых генов при данном типе рака отмечено впервые.

Для перечисленных генов также было зафиксировано значимое снижение уровня их экспрессии в опухолевых образцах по отношению к нормальной ткани, тогда как для белок-кодирующего гена TET2 наблюдали увеличение уровня экспрессии в опухолевой ткани (рис. 1). Эти данные позволяют предположить опухоль-супрессорную функцию продуктов генов TET1, ADAMTS9-AS2, SNHG6, GAS5 и онкогенную роль продукта гена TET2 при светлоклеточном раке почки.

При оценке вовлеченности метилирования промоторных CpG-островков исследованных генов в изменение их уровня экспрессии были обнаружены стати-

Таблица 3/ Table 3

Уровень метилирования генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в образцах скПКР и прилежащей гистологически нормальной ткани почки

TET1, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes methylation level in ccRCC samples and adjacent histologically normal kidney tissue

Название гена	p=	Me (Q1-Q3)	
		Опухоль	Норма
<i>TET1</i>	<0.001	22.57 (11.69–40.84)	7.53 (3.71–11.33)
<i>TET2</i>	0.841	3.71 (3.22–4.24)	3.73 (3.24–4.30)
<i>ADAMTS9-AS2</i>	0.019	10.84 (3.94–35.73)	7.78 (3.26–14.19)
<i>SNHG6</i>	<0.001	19.59 (12.08–35.81)	6.88 (3.46–13.13)
<i>GAS5</i>	<0.001	16.71 (9.24–21.51)	6.60 (3.92–13.37)

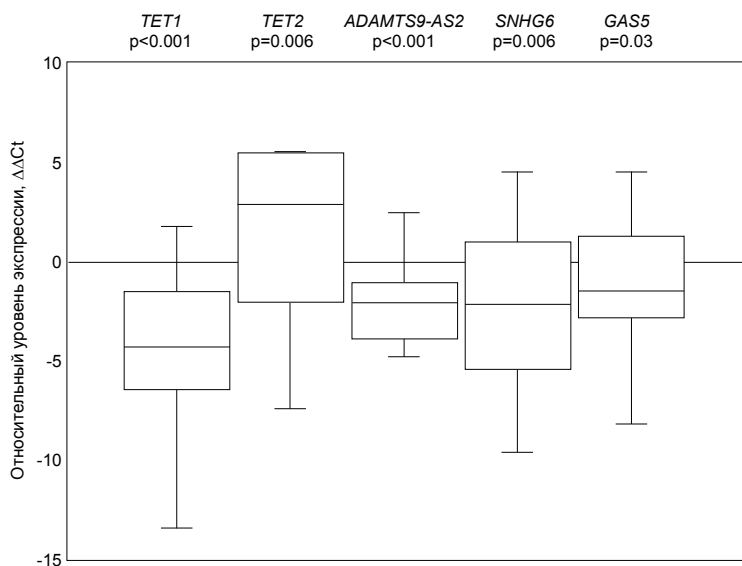


Рис. 1. Уровни экспрессии генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* (20 парных образцов скПКР) измеренные с помощью количественной SYBR Green ПЦР в режиме реального времени.

Fig. 1. Expression levels of *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* genes (20 paired ccRCC samples) measured by SYBR Green qPCR-RT.

Ген	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>ADAMTS9-AS2</i>	<i>SNHG6</i>	<i>GAS5</i>
r_s	-0,248	0,235	-0,686	-0,570	-0,608
p-значение	0,291	0,319	<0,001	0,009	0,004



Рис. 2. Вовлеченность aberrantного метилирования в дерегуляцию экспрессии генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* при скПКР; r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Fig. 2. Involvement of aberrant methylation in deregulation of *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* gene expression in ccRCC; r_s – Spearman correlation coefficient.

стически значимые отрицательные корреляции между изменением уровня метилирования и уровнем экспрессии для трех генов днРНК – *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* (рис. 2). Для БКГ *TET1*, *TET2* достоверных ассоциаций показано не было.

Выявленные в ходе настоящей работы закономерности изменения уровней метилирования и экспрес-

сии гена *TET1* подтверждаются данными зарубежных исследований, выполненных на образцах больных с другими видами рака. В частности, ранее сообщалось о сниженной в результате гиперметилирования экспрессии этого гена при карциноме носоглотки [14]. Гиперэкспрессия гена *TET2* ранее была отмечена при внутрипеченочной холангиокарциноме и определена

как независимый фактор неблагоприятного прогноза у пациентов с этим видом опухоли [15]. Необходимо подчеркнуть, что наличие исследований, демонстрирующих антагонистические паттерны экспрессии обеих представителей семейства TET, говорит о тканеспецифичной роли деметилирующих ферментов в патогенезе рака [3].

В большинстве онкопатологий днРНК ADAMTS9-AS2 функционирует в качестве онкосупрессора. Так, в работе [16] показано, что она выступает в роли регулятора в сети передачи сигналов по сигнальному пути PI3K/AKT/mTOR, тем самым способствуя выживанию и росту клеток в опухоли, а также эпигенетического регулятора путем связывания «sponge» микроРНК. В то-

же время, наши данные о гиперметилировании и сниженной экспрессии гена ADAMTS9-AS2 при скПКР указывают на опухоль-супрессорную функцию продукта гена и подтверждаются рядом публикаций зарубежных авторов [17, 18].

ДнРНК SNHG6, напротив, гиперэкспрессируется и демонстрирует различные онкогенные эффекты в большинстве солидных опухолей. В основе ее онкогенных свойств лежит регуляция ряда сигнальных путей опухолевых клеток, включая TGFβ/SMAD, Wnt/β-катенин, PI3K/AKT/mTOR, JNK, а также конкурентное связывание онкосупрессорных микроРНК [19]. Тем не менее, имеются единичные публикации, отмечающие снижение уровня экспрессии SNHG6,

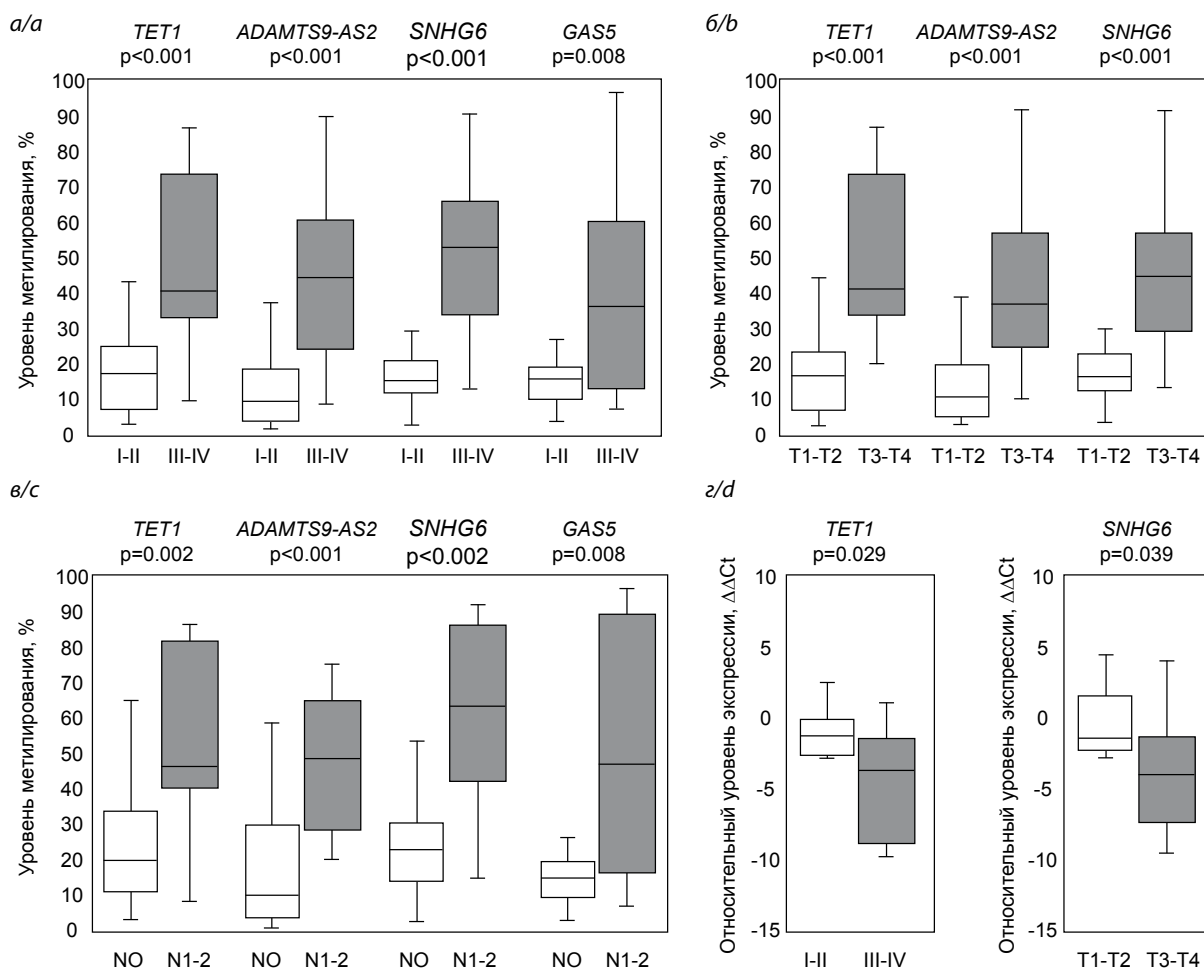


Рис. 3. Связь уровня метилирования исследованных генов со стадией онкологического процесса (а), размером опухоли (б) и наличием лимфогенного метастазирования (в). Связь уровня экспрессии исследованных генов со стадией онкологического процесса (з) и размером опухоли (д).

Fig. 3. The relationship between the methylation level of the studied genes and the stage of the oncological process (a), tumor size (b) and the presence of lymphogenous metastasis (c). The relationship between the expression level of the studied genes and the stage of the oncological process (d) and tumor size (e).

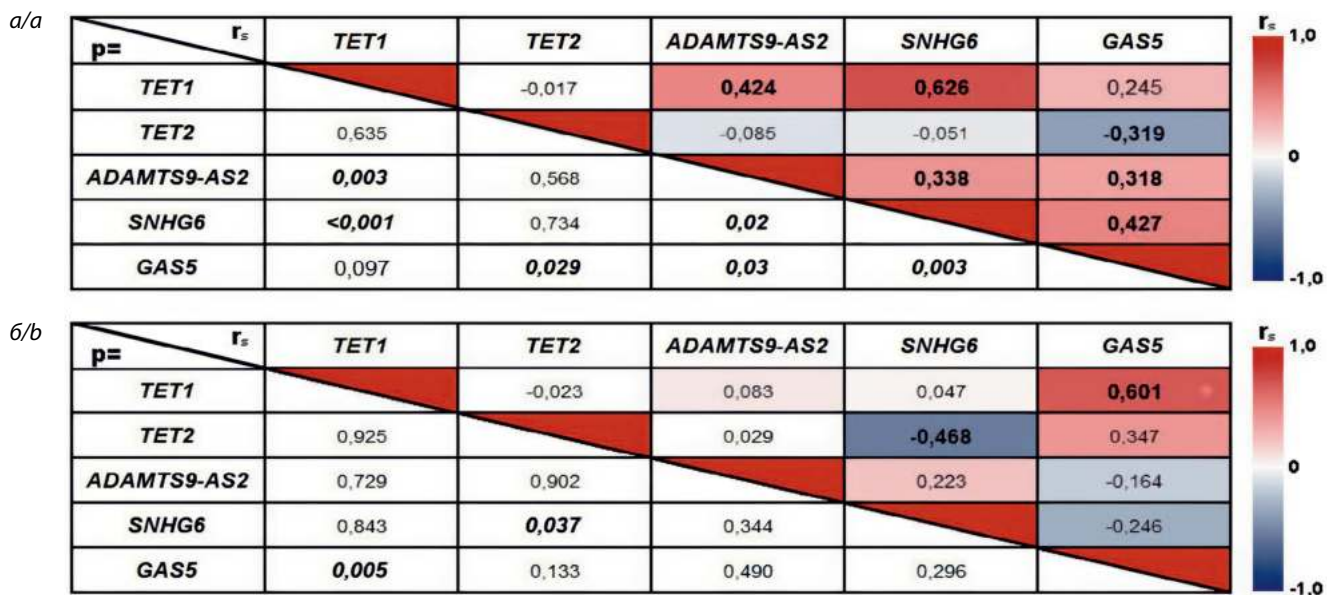


Рис. 4. Кометиляция (а) и коэкспрессия (б) генов днРНК и БКГ; r_s – коэффициент корреляции Спирмена; статистически значимые корреляции выделены жирно курсивом ($p \leq 0.05$).

Fig. 4. Comethylation (a) and coexpression (b) of lncRNA and PCG genes; r_s – Spearman correlation coefficient; statistically significant correlations are highlighted in bold italics ($p \leq 0.05$).

что согласуется с нашими результатами и может говорить о тканеспецифичности этого гена при раке [20].

Подобно двум другим анализируемым днРНК, *GAS5* вовлечена в регуляцию широкого спектра сигнальных путей, ответственных за контроль пролиферации и выживаемости раковых клеток. Как и в нашем исследовании, в подавляющем большинстве научных публикаций сообщается о снижении уровня этого транскрипта при различных типах рака, в некоторых также отмечается вовлеченность гиперметилования промоторной области в подавление экспрессии *GAS5*, что опять же согласуется с результатами настоящей работы [21, 22].

Во второй части исследования анализировали изменение уровня метилирования и экспрессии генов *TET1*, *TET2*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в образцах первичных опухолей скПКР с учетом их патоморфологических особенностей (стадии опухолевого процесса, размера опухоли, наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования).

Проведенный анализ позволил выявить статистически значимую связь между повышением уровня метилирования всех генов днРНК (*ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS*), а также белок-кодирующего гена *TET1* и увеличением тяжести течения скПКР (стадии I-II против III-IV) (рис. 3, а/а). Для генов *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS* и *TET1* также были обнаружены значимые различия уровня метилирования у пациентов с наличи-

ем и отсутствием метастазов в лимфатические узлы (N0 против N1-2) (рис. 3, в/в). Стоит отметить, что увеличение уровня метилирования генов *TET1*, *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* было достоверно связано с увеличением размера новообразования (T1-T2 против T3-T4) (рис. 3, б/б).

При анализе уровня экспрессии исследуемых генов с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок, была выявлена статистически значимая ассоциация низкого уровня экспрессии гена *ADAMTS9-AS2* с более тяжелыми (III-IV) стадиями онкологического процесса (рис. 3, з/д), а гена *SNHG6* – с увеличением размера первичной опухоли (T1-T2 против T3-T4) (рис. 3, д/е).

Приведенные результаты косвенно подтверждаются данными, представленными в единичных зарубежных публикациях. Так, связь гиперметилования промоторной области гена *GAS5* со стадией заболевания и наличием лимфогенного метастазирования ранее была продемонстрирована при раке шейки матки [22]. А для гена *ADAMTS9-AS2* ассоциации между снижением уровня экспрессии гена и увеличением стадии опухолевого процесса показана в работах, выполненных на образцах рака желудка, молочной железы и ряде других типов опухолей [23, 24].

С использованием коэффициента корреляции Спирмена (r_s) в ходе настоящего исследования нами также был выполнен поиск генов днРНК и БКГ, кометилованных и коэкспрессируемых при светлоклеточном раке почки

(рис. 4). В результате была выявлена статистически значимая положительная корреляция между уровнями метилирования промоторных областей генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6* и белоккодирующего гена *TET1*, что может свидетельствовать о вовлеченности продуктов кометилированных пар генов в общие биологические процессы и сигнальные пути при развитии скПКР. Вместе с тем, однонаправленное изменение уровня экспрессии было показано для генов *GAS5* и *TET1*. В этом случае уместно предположить наличие опосредованного взаимодействия между указанной днРНК и мРНК гена *TET1* при посредничестве микроРНК. Проведенный анализ также позволил выявить обратную корреляцию уровней метилирования генов *GAS5* и *TET2* и уровней экспрессии генов *SNHG6* и *TET2*, что может говорить о прямом воздействии перечисленных днРНК на уровень мРНК БКГ и/или кодируемого им белка.

Заключение

Результаты настоящей работы позволяют предположить участие aberrантного метилирования белок-кодирующего гена *TET1* и генов днРНК *ADAMTS9-AS2*, *SNHG6*, *GAS5* в возникновении и прогрессии светлоклеточного рака почки. Стоит отметить, что наши выводы относительно природы выявленных корреляционных зависимостей уровней метилирования или экспрессии для пяти пар генов являются предварительными и требуют проверки в ходе дальнейших исследований. Полученные данные могут способствовать разработке новых диагностических и прогностических биомаркеров скПКР, а также терапевтических стратегий, направленных на коррекцию эпигенетических изменений при данном заболевании.

Литература

(п.п. 1–4; 6–24 см. References)

5. Буре И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. Длинные некодирующие РНК и их роль в онкогенезе. *Молекулярная биология*. 2018; 52(6): 907–20. <https://doi.org/10.1134/S0026898418060034>

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>

2. Makhov P., Joshi S., Ghatelia P., Kutikov A., Uzzo R.G., Kolenko V.M. Resistance to systemic therapies in clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and management strategies. *Mol Cancer Ther*. 2018; 17(7): 1355–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1299>

3. Joshi K., Liu S., Breslin S.J.P., Zhang J. Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2022; 79(7): 363. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04396-x>

4. 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>

5. Bure I.V., Kuznetsova E.B., Zалетаев D.V. Long noncoding RNAs and their role in oncogenesis. *Молекулярная Биология*. 2018; 52(6): 787–98. <https://doi.org/10.1134/S0026893318060031> (in Russian)

6. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Union for International Cancer Control (UICC). TNM classification of malignant tumours, 8th edn. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2017.

7. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., et al. Aberrant methylation of 20 mirna genes specifically involved in various steps of ovarian carcinoma spread: from primary tumors to peritoneal macroscopic metastases. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(3): 1300. <https://doi.org/10.3390/ijms23031300>

8. 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>

9. Lukina S.S., Burdenny A.M., Filippova E.A., Uroshlev L.A., Pronina I.V., Ivanova N.A., et al. Methylation of long noncoding RNA Genes SNHG6, SNHG12, and TINCR in ovarian cancer. *Molecular Biology*, 2024; 58(3): 429–38. <https://doi.org/10.1134/S0026893324700067>

10. Burdenny A.M., Lukina S.S., Uroshlev L.A., Filippova E.A., Pronina I.V., Fridman M.V., et al. Hypermethylation in ovarian cancer of long noncoding RNA Genes: HOTAIR, GAS5, LINC00472, LINC00886, TUG1. *Russ J Genet*. 2024; 60(5): 665–75. <https://doi.org/10.1134/S1022795424700029>

11. Guo H., Zhu H., Zhang J., Wan B., Shen Z. TET1 suppresses colon cancer proliferation by impairing β -catenin signal pathway. *J Cell Biochem*. 2019; 120(8): 12559–65. <https://doi.org/10.1002/jcb.28522>

12. Ichimura N., Shinjo K., An B., Shimizu Y., Yamao K., Ohka F., et al. Aberrant TET1 methylation closely associated with CpG Island methylator phenotype in colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015; 8(8): 702–11. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0306>

13. 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>

14. Fan J., Zhang Y., Mu J., He X., Shao B., Zhou D., et al. TET1 exerts its anti-tumor functions via demethylating DACT2 and SFRP2 to antagonize Wnt/ β -catenin signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *Clin Epigenetics*. 2018; 10(1):103. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0535-7>

15. Yamashita H., Tournara A., Akita M., Itoh T., Chokshi S., Ajiki T., et al. Epigenetic upregulation of TET2 is an independent poor prognostic factor for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Virchows Arch*. 2022; 480(5): 1077–85. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03251-x>

16. Xu W., Wang B., Cai Y., Chen J., Lv X., Guo C., et al. ADAMTS9-AS2: A functional long non-coding RNA in tumorigenesis. *Curr Pharm Des*. 2021; 27(23): 2722–7. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210325105106>

17. Deva Magendhra Rao A.K., Patel K., Korivi Jyothiraj S., Meenakumari B., Sundersingh S., Sridevi V., et al. Identification of In-

- cRNAs 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>
18. Song E.L., Xing L., Wang L., Song W.T., Li D.B., Wang Y., et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits cell proliferation and decreases chemoresistance in clear cell renal cell carcinoma via the miR-27a-3p/FOXO1 axis. *Aging (Albany NY).* 2019; 11(15): 5705-25. <https://doi.org/10.18632/aging.102154>
 19. Wang H.S., Zhang W., Zhu H.L., Li Q.P., Miao L. Long noncoding RNA SNHG6 mainly functions as a competing endogenous RNA in human tumors. *Cancer Cell Int.* 2020; 20: 219. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01303-x>
 20. Meng S., Jian Z., Yan X., Li J., Zhang R. LncRNA SNHG6 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via the PI3K/AKT/mTOR pathway in colorectal cancer. *Mol Med Rep.* 2019; 20(3): 2541-48. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10510>
 21. Zhang N., Wang A.Y., Wang X.K., Sun X.M., Xue H.Z. GAS5 is downregulated in gastric cancer cells by promoter hypermethylation and regulates adriamycin sensitivity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(15): 3199-205.
 22. Yang W., Xu X., Hong L., Wang Q., Huang J., Jiang L. Upregulation of lncRNA GAS5 inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cells. *J Cell Physiol.* 2019; 234(12): 23571-80. <https://doi.org/10.1002/jcp.28926>
 23. Ren N., Jiang T., Wang C., Xie S., Xing Y., Piao D., et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits gastric cancer (GC) development and sensitizes chemoresistant GC cells to cisplatin by regulating miR-223-3p/NLRP3 axis. *Aging (Albany NY).* 2020; 12(11): 11025-41. <https://doi.org/10.18632/aging.103314>
 24. Ni K., Huang Z., Zhu Y., Xue D., Jin Q., Zhang C., et al. The lncRNA ADAMTS9-AS2 regulates RPL22 to modulate TNBC progression via controlling the TGF- β signaling pathway. *Front Oncol.* 2021; 11: 654472. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.654472>

Сведения об авторах:

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

Иванова Наталья Анатольевна, мл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «НИИОПП»;

Селезнева Алена Дмитриевна, лаборант-исследователь, лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «НИИОПП»;

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

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»; мл. науч. сотр. лаб. химической физики биоаналитических процессов ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

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, 2025

УДК 616-008

Карганов М.Ю.¹, Алчинова И.Б.¹, Деморжи М.С.¹, Черепов А.Б.¹, Метёлкин А.А.¹, Онищенко Н.А.²,
Никольская А.О.², Степанова О.И.³, Клёсов Р.А.³, Семёнов Х.Х.³, Проценко А.Н.⁴, Нестеренко М.В.⁵, Басок Ю.Б.²

Изменения метаболизма и состояния клеток системы крови и костного мозга при курсовом применении Лактоферрина на различных этапах развития сахарного диабета 2 типа

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва, Россия, ул. Щукинская, д. 1;

³ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, 143442, МО, Красногорский р-н, п. Светлые горы, Россия, д. 1;

⁴ИКМ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117513, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

⁵ООО «Лактобио», 119331, Москва, Россия, просп. Вернадского, д. 29

Цель – изучить динамику метаболизма и состояние клеток крови и костного мозга при курсовом применении Лактоферрина (Лф) в различные периоды прогрессирующего развития сахарного диабета 2 типа (СД2).

Методика. Опыты выполнены на 40 мышах db/db с генетической моделью СД2 и на 10 мышах db/+m (здоровый контроль). Мыши db/db составили 2 группы: 1 – СД2 контроль ($n=10$); 2 – состояла из 3 подгрупп с СД2 ($n=30$), в которых применяли 1% питьевой раствор Лф сроком до 2 мес на 3-х стадиях различной степени тяжести состояния животного: I стадия адаптации; II стадия прогрессирующей дезадаптации; III стадия декомпенсации. На этих стадиях в динамике исследовали уровень глюкозы в крови, вес животного, показатель окислительного метаболизма (ПОМ) в тканях, состояние клеток крови и костного мозга. Статистическую обработку результатов проводили с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса. Достоверность различий с контролем оценивали с помощью параметрического критерия t -Стьюдента, при $p<0,05$.

Результаты. Применение Лф на I и II стадиях СД2 стабилизировало уровень глюкозы и вес животных, а после отмены Лф способствовало нормализации этих показателей. К концу применения Лф на III стадии СД2 эти показатели резко снижались, и животные быстро погибали. ПОМ при введении Лф на I, II и III стадиях СД2 всегда снижался, но после отмены Лф – ПОМ повышался и становился выше исходного уровня на I и II стадиях СД2. Соответствующие стресс-адаптивные изменения были выявлены также для клеток крови и костного мозга, развитие которых осуществлялось при участии механизмов программируемой гибели клеток

Заключение. Лактоферрин при курсовом применении для коррекции клинических проявлений СД2 действует как мощный адаптоген и способен оказать адьювантное воздействие на метаболизм и состояние клеток системы крови и костного мозга, но лишь при сохранившихся в организме адаптационных резервах.

Ключевые слова: сахарный диабет; Лактоферрин; окислительно-восстановительные процессы; клетки крови; костный мозг

Для цитирования: Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Деморжи М.С., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Онищенко Н.А., Никольская А.О., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Проценко А.Н., Нестеренко М.В., Басок Ю.Б. Изменения метаболизма и состояния клеток системы крови и костного мозга при курсовом применении Лактоферрина на различных этапах развития сахарного диабета 2 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 14–28.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.14-28

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Онищенко Н.А., Карганов М.Ю.; сбор материала – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Никольская А.О.; техническая подготовка материала – Алчинова И.Б., Деморжи М.С., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Никольская А.О., Семенов Х.Х., Нестеренко М.В.; подготовка иллюстративного материала к публикации – Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Степанова О.И., Никольская А.О.; написание текста – Онищенко Н.А.; редактирование – Карганов М.Ю., Басок Ю.Б. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Работа частично выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка физиологического баланса организма при воздействии экстремальных факторов среды». (FGFU-2025-0003).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.10.2024

Принята к печати 06.02.2025

Опубликована 27.03.2025

Karganov M.Yu.¹, Alchinova I.B.¹, Demorzhi M.S.¹, Cherepov A.B.¹, Metelkin A.A.¹, Onishchenko N.A.², Nikolskaya A.O.², Stepanova O.I.³, Klyosov R.A.³, Semenov Kh.Kh.³, Protsenko A.N.⁴, Nesterenko M.W.⁵, Basok Yu.B.²

Changes in the metabolism and state of blood and bone marrow cells during a course of Lactoferrin treatment at various stages of the development of type 2 diabetes mellitus

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

²Shumakov National Medical Research Center of transplantology and artificial organs, 1 Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation;

³«Scientific Center of Biomedical Technologies» FMBA of Russia, 1 Svetlye Gory village, Moscow Region, Krasnogorsk district, 143442, Russian Federation;

⁴Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanov St., Moscow, 117513, Russian Federation;

⁵LLC «Lactobio», 29 Vernadsky Avenue, Moscow, 119331, Russian Federation

The aim was to study time-related changes in the metabolism and state of blood and bone marrow cells during a course of Lactoferrin (Lf) treatment in various periods of the progression of type 2 diabetes mellitus (DM2).

Methods. Experiments were performed on 40 db/db mice with genetically modeled DM2 and 10 healthy db/+m mice (control). The db/db mice were divided into two groups: Group 1 was the control ($n=10$) and Group 2 consisted of three subgroups with DM2 ($n=30$). The DM2 subgroups received a 1% Lf drinking solution for up to two months during three stages of DM2 severity: stage 1, adaptation; stage 2, progressive disadaptation; and stage 3, decompensation. At these stages, blood glucose concentration, body weight, index of oxidative metabolism (IOM) in tissues, and the state of blood and bone marrow cells were assessed. Statistical analysis was performed after a preliminary use of the Shapiro–Wilks test. The significance of differences from the control was assessed with the parametric Student's t test at $p<0.05$.

Results. The use of Lf at stages 1 and 2 of DM2 stabilized the glucose concentration and body weight and contributed to normalization of their values after the Lf discontinuation. By the end of the Lf treatment at stage 3, these indices sharply decreased and the animals died. During the Lf treatment at stages 1, 2 and 3 of DM2, the IOM always decreased, but after the Lf discontinuation, the IOM increased and became higher than the background level, if Lf was administered at stages 1 and 2. Respective stress-adaptive changes were also identified for blood and bone marrow cells that developed with the participation of programmed cell death mechanisms.

Conclusion. The Lactoferrin course treatment used for the correction of clinical manifestations of DM2 works as a powerful adaptogen and is capable of producing an adjuvant effect on the metabolism and state of blood and bone marrow cells, but only if the adaptive reserves of the body are preserved.

Keywords: diabetes mellitus; Lactoferrin; redox processes; blood and bone marrow cells

For citation: Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Demorzhi M.S., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Onishchenko N.A., Nikolskaya A.O., Stepanova O.I., Klyosov R.A., Semenov Kh.Kh., Protsenko A.N., Nesterenko M.W., Basok Yu.B. Changes in the metabolism and state of blood and bone marrow cells during a course of Lactoferrin treatment at various stages of the development of type 2 diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 14–28. (In Russian). DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.14-28

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.14-28

Author's contribution: concept and design of the study – Onishchenko N.A., Karganov M.Yu.; collection of material – Stepanova O.I., Klyosov R.A., Nikolskaya A.O.; technical preparation of the material – Alchinova I.B., Demorzhi M.S., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Stepanova O.I., Klyosov R.A., Nikolskaya A.O., Semenov Kh.Kh., Nesterenko M.W.; preparation of illustrative material for publication – Alchinova I.B., Cherepov A.B., Stepanova O.I., Nikolskaya A.O.; writing the text – Onishchenko N.A.; editing the text – Karganov M.Yu., Basok Yu.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

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

Information about the authors:

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

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

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

Cherepov A.B., <https://orcid.org/0000-0002-3757-5292>

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

Onishchenko N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0889-8674>

Nikolskaya A.O., <https://orcid.org/0000-0001-7410-6500>

Stepanova O.I., <https://orcid.org/0009-0005-6511-3975>

Klyosov R.A., <https://orcid.org/0000-0001-8029-6486>

Protsenko A.N., <https://orcid.org/0009-0003-7468-998X>

Nesterenko M.W., <https://orcid.org/0000-0002-0504-9853>

Basok Yu.B., <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Financing. The work was partially carried out within the framework of the state assignment on the topic: «Assessment of the body's adaptive reactions to the action of physicochemical and environmental environmental factors» (№ FGUFU-2022-0010)

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Received 16.10.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Заболеваемость сахарным диабетом 2 типа (СД2) в современном мире приобрела характер пандемии [1]. Полагают, что развитие СД2, характеризующееся утратой метаболического контроля углеводного и липидного обмена, в значительной степени обусловлено накоплением эпигенетических модификаций в метаболических системах поджелудочной железы и печени [2, 3]. Именно поэтому совершенствование терапии СД2 осуществляют по трём направлениям: путём применения строгих режимов питания, физических нагрузок и эффективных медикаментозных препаратов. В настоящее время в распоряжении медицины имеется значительный арсенал антидиабетических препаратов [4], однако, большинство из них имеют существенные потребительские ограничения (побочные эффекты, недостаточная биосовместимость и безопасность) [5]. В связи с этим разработка и применение новых антидиабетических препаратов с высокой эффективностью и надёжной безопасностью остается актуальной проблемой современной фармакотерапии СД2. Недавнее признание того факта, что вещества, выделенные из натурального продукта, могут быть регуляторами метаболического баланса в организме, позволило рассматривать нутрицевтики в качестве возможных кандидатов для адьювантной терапии метаболических нарушений в организме [6]. Среди нутрицевтических белков – Лактоферрин (Лф), выделенный из молока человека и коров и представляющий собой железосвязывающий гликопротеин врождённой иммунной системы с молекулярной массой 80 КДа, особенно привлек внимание исследователей [7, 8].

Оказалось, что взаимодействие Лф с повсеместно присутствующими лактоферриновыми рецепторами в клетках позволяет проявлять железотранспортную, антиоксидантную, иммунорегуляторную, противомикробную и противоопухолевую активность [9-11], а также служить действенным регулятором метаболизма при различных патологиях. Первые доказательства регуляторной взаимосвязи между эндогенным уровнем Лф в организме и метаболическими нарушениями были получены у больных с инсулиновой резистентностью и изменённой толерантностью к глюкозе [12]. Доказательства антидиабетической активности Лф были получены также на детях с повышенной массой тела [13], у которых наступало снижение гликозилированного гемоглобина в эритроцитах, индекса массы тела и улучшение липидного состава крови. В опытах на животных [14] было установлено, что курсовое поступление в организм 1% раствора Лф в составе питьевой

воды способствовало снижению холестерина в печени и нормализации липидного состава сыворотки крови у мышей, получающих высокожировую диету. Кроме того, при курсовом введении Лф происходило снижение содержания провоспалительного фактора TNF α в печени и IL-6 в сыворотке крови и повышение инсулиновой сигнализации метаболических путей в печени, что способствовало облегчению трансмембранного транспорта глюкозы и сдерживанию механизмов глюконеогенеза в печени [15]. Между тем, в отдельных работах [10, 15] упоминаются исследования, в которых не было выявлено снижения уровня гликемии и липидемии при СД2 под влиянием Лф.

Представленные в литературе доказательства нормализующего воздействия Лф на углеводный и липидный обмен при СД2 позволяют, однако, лишь предположить, что Лф способствует восстановлению метаболизма не только в печени и поджелудочной железе, но и в других жизненно важных органах, таких как костный мозг, клетки которого участвуют в развитии сосудистых осложнений [16-18], иммунных дисфункций [19-21] и в усиливаемом торможении процессов восстановительной регенерации [22, 23]. Однако, данных о влиянии Лф на состояние клеток крови и костного мозга, а также состояние окислительно-восстановительных процессов в организме в процессе его курсового применения на различных этапах прогрессирующего развития СД2 мы в литературе не обнаружили. Между тем, степень тяжести метаболических нарушений в организме при СД2 может оказать существенное влияние на реализацию терапевтического потенциала Лф.

Цель работы – в опытах на мышах с генетической моделью СД2 изучить влияние курсового применения Лф в составе питьевого раствора на динамику метаболизма и состояния клеток крови и костного мозга в зависимости от степени тяжести нарушения окислительного метаболизма в тканях организма на этапах прогрессирующего развития СД2.

Методика

Работа выполнена на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+, которые были предоставлены ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. Все экспериментальные животные содержались по 5 особей в клетке в условиях свободного доступа к воде и пище на рационном питании (без диет), соответствующем нормативам ГОСТа. Животные соответствовали категории конвенциональных.

В качестве рациона получали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабора-

торных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 518492001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным поступала в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18-22°C, относительной влажности 60-70% и искусственном освещении с циклом 12/12. При проведении исследований руководствовались: ГОСТ 33216-2014.

Проведение настоящего экспериментального исследования было рассмотрено и одобрено локальным Этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП» (протоколы № 2 от 04.04.2023 и № 3 от 07.05.2024).

Характеристика экспериментальных животных. Влияние курсового применения Лактоферрина (Лф) на этапах прогрессирующего развития СД2 изучали на мутантных гомозиготных мышах C57BL/KsJYLeprdb/+(B/Ks-Leprdb/+) – (db/db), которые несут рецессивный ген – leptin receptor – Leprdb – (db) (8 группа сцепления, 4 хромосома). Ген db в гомозиготном состоянии вызывает прогрессирующее развитие СД, что обусловлено снижением рецептор-опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину. Развивающийся СД сходен с СД2 и характеризуется деградацией клеток в островках поджелудочной железы, но без дефицита выработки инсулина на ранних сроках. Общее количество мутантных мышей – диабетиков линии B/Ks-Leprdb/Leprdb (db/db) обоих полов, использованных в эксперименте, составило 40 особей ($n=40$). Мыши с генетической моделью СД2 были разбиты на 2 группы: 1-я группа служила контролем, в которой животные с СД2 не получали терапию Лф в течение всего эксперимента ($n=10$); 2-я группа – опытная ($n=30$), которая состояла из 3-х подгрупп, в каждой из которых мыши с СД2 получали 1% питьевой раствор Лф в течение 2-х мес, но в разные периоды прогрессирующего нарушения метаболизма (см. раздел «Результаты»). В 1-й подгруппе Лф включали в рацион мышей в возрасте 1,0-1,5 мес; во 2-й подгруппе Лф включали в питьевой раствор в возрасте 2,5-4,0 мес; в 3-й подгруппе Лф включали в питьевую воду мышей в возрасте 5,0-6,0 мес. В качестве второго контроля использовали фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии – B/Ks-Leprdb/+ – (db/+m) ($n=10$). Общее количество мышей, использованных в эксперименте, составило 50 особей. В работе использовали Лф (коммерческое название Биферрин), изготовленный из коровьего молока по ТУ 10.89.19-001-49293427-2018 в ООО «НПК Растительные Ресурсы», Санкт-Петербург, РФ.

Методы, использованные для оценки тяжести состояния животных. У контрольных и опытных мы-

шей в течение 8,0-10,5 мес в динамике изучали изменения ряда показателей, которые отражают степень тяжести клинического состояния животного при СД2. Измеряли массу тела, количество выпитой воды в сутки, содержание глюкозы в крови, а также оценивали состояние окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в тканях организма. Содержание глюкозы определяли в свежей венозной (капиллярной) крови фотометрическим методом на приборе Accu-Chek Active (Швейцария). Вес животных определяли еженедельно в одно и то же время с помощью весов Mettler BD202 (Швейцария). Динамическая оценка состояния ОВП производилась неинвазивно с помощью аппарата лазерной доплеровской флуометрии – «Лазма-СТ» [24]. Этот аппарат позволяет измерять микроциркуляцию крови и лимфы в тканях хвоста, определять в этих тканях уровень активности митохондриальных коферментов – НАДН, ФАД и на основании полученных результатов автоматически рассчитывать показатель окислительного метаболизма (ПОМ) [24]. Определение в динамике в процессе жизни животных тканевого уровня микроциркуляции, активности митохондриальных коферментов, ПОМ, веса и содержания глюкозы в крови позволило выявить 3 периода (этапа) развивающихся нарушений метаболизма в организме мутантных мышей с СД2: 1,0-2,0 мес после рождения – период адаптивных изменений – (I); 2,0-4,5 мес – период прогрессирующей дезадаптации – (II) и 5,0-6,5 мес и до гибели животных – период декомпенсации метаболизма – (III) (см. раздел «Результаты»). Именно на этих сроках мыши опытной группы получали Лф.

Для выполнения гистологических исследований материал в виде небольших кусочков печени использовали для изготовления срезов тканей толщиной 6-7 мкм на микротоме Leitz –1208 (ФРГ). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали на микроскопе Olympus CX31 (Япония). В контрольной и опытной группах на различных этапах развития СД2 проводили исследование изменений в состоянии клеток крови и костного мозга.

Методы исследования состояния клеток крови и костного мозга. Для исследования клеток крови смешанную кровь, полученную при декапитации, забирали в пробирки с K_3 ЭДТА (Трикалиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Оценку гематологических показателей – (RBC $10^{12}/л$ – эритроциты, HGB, г/л – гемоглобин, HCT, % – гематокрит, MCV, фемтолитр – средний объем эритроцита, MCH, пикограмм – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC, г/л – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, RDW-CV, % – ширина распределения эритроци-

тов, RDW-SD, % – ширина распределения эритроцитов (стандартное отклонение); PLT 10^9 /л – тромбоциты, PDW, % – относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму, PCT, % – тромбокрит, MPV, фемтолитр – средний объём тромбоцита; WBC 10^9 /л – лейкоциты, Neu, % – нейтрофилы, Lymph, % – лимфоциты, Mono, % – моноциты, Eosi, % – эозинофилы, Baso, % – базофилы) проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIN D VET DF50 (Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Данные представляли как средний результат из трёх промеров.

Клетки костного мозга для исследования выделяли из бедренной и большой берцовой костей мышей с использованием стандартного протокола [25]. После тщательного очищения этих костей от мышц и связок отсекали эпифизы и кости помещали в 0,5 мл стандартные пластиковые центрифужные пробирки с заранее проколотым с помощью иглы (G18-21) дном. Эти пробирки помещали внутрь пластиковых центрифужных пробирок объемом 1,5 мл и центрифугировали 15 с при 10 000 g. В результате выделенные клетки костного мозга оказывались в большой пробирке.

Для оценки выраженности апоптоза в клетках костного мозга использовали детекцию фосфатидилсерина на внешней мембране клеток с помощью меченого аннексина V. Количество аннексин+ клеток оценивали, используя набор для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF 488 (Lutiprobe, Россия) по стандартному протоколу с последующей проточной цитометрией [26]. Для определения нарушения целостности клеточной мембраны (апонекроз) использовали йодистый пропидий (Lutiprobe, Россия). Его добавляли в пробы перед измерением на проточном цитометре до концентрации 0,5-1,0 мкг/мл.

Свежеприготовленные образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США), оснащённым аргоновым лазером (488 нм). Эмиссию флуоресценции (AF488, FITS) регистрировали в канале FL1 (515-545 нм) и в диапазоне йодистого пропидия FL2 (620 нм). Для каждого образца накапливалось от 15000 до 25000 событий. Сбор данных проводили с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson, США). Данные полученные в пилотном исследовании обрабатывали в программе FlowJo. Результаты анализировали с учетом рекомендаций, изложенных L.C. Crowley и соавт. [26], с установкой таргетного гейта.

Статистическая обработка результатов. Численные значения ПОМ, глюкозы и массы тела в 3-х исследуемых периодах развития СД2 (до 8,0-8,5 мес или гибели животных) подвергали статистической обработке с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса на небольшом количестве выборок ($n > 5$) для доказательства нормального распределения данных, характеризующих метаболизм в отдельные периоды. Достоверность различия показателей в сравниваемые периоды оценивали с помощью t – критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Office Excel 2021). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для оптимизации корректирующего воздействия Лф на углеводный обмен в организме мы считали важным, прежде всего, определить на каком этапе прогрессирующего развития СД2 у мышей применение этого препарата способно оказать наиболее выраженный терапевтический эффект.

1. Стадии (этапы) прогрессирующего развития СД2.

Выполнение комплексного динамического исследования изменений содержания глюкозы в крови, массы тела и микроциркуляторно-тканевых показателей окислительного метаболизма (НАДН, ФАД и ПОМ) начиная с 1,0 – 1,5 мес и до 10 – 10,5 мес жизни мышей позволило выявить 3 временных периода прогрессирующего нарушения измеряемых показателей. Было установлено (**рис. 1**), что на сроке жизни мышей 1,0 – 1,5 мес на фоне нарастающей гипергликемии и массы тела повышалась амплитуда активности НАДН и ФАД и снижались значения ПОМ; однако, при сравнении с контролем (мышы db/+m) (**рис. 1**) выявленные изменения показателей ОВП были недостоверны. Этот срок развития СД2 был признан I стадией СД2 – стадией адаптации.

Формирование клинических признаков дезадаптации обнаруживается на сроке 2,0 – 2,5 мес (значительное повышение веса, уровня гликемии и развитие полиурии) и их прогрессирующее продолжается до 4,0 – 4,5 мес. В этом временном периоде достоверно прогрессирует тяжесть нарушения показателей ОВП – ПОМ (**рис. 1**) и начинается снижение веса, но ещё не проявляются сосудистые осложнения. Период 2,0 – 4,5 мес был признан II стадией СД2 и назван стадией прогрессирующей дезадаптации. Начиная с возраста 5,0 – 6,5 мес у мышей на фоне углубляющегося нарушения клинических показателей и показателей, характеризующих состояние ОВП в тканях организма, у 30% животных развивались осложнения (мацерация кожи, чаще всего в области холки, которая становилась обширной незаживающей раной вплоть до их гибели на 7 – 10 мес).

Этот период (с 5 – 6,5 мес и до гибели животных) был признан III – терминальной стадией развития СД2 или стадией декомпенсации адаптационных механизмов с развитием глубокой тканевой гипоксии.

2. Влияние ЛФ на показатели окислительного метаболизма, углеводного обмена и гистологического состояния печени на различных стадиях СД2. На установленных временных сроках формирования отдельных этапов прогрессирующего развития СД2 нами в 3-х подгруппах мышей опытной группы проводилась курсовая терапия 1% водным раствором Лактоферрина (ЛФ), свободно поступающего в организм в течение 60 дней (2 мес) в виде питьевого раствора. Контролем служили мыши с СД2 без терапии ЛФ на всём сроке наблюдения (рис. 1). На рис. 2 представлена динамика концентрации глюкозы в крови (рис. 2, а/а), массы тела (рис. 2, б/б) и значения амплитуды показателя окислительного метаболизма (ПОМ) в тканях (рис. 2, в/в) у мышей с СД2 при доставке ЛФ в организм на разных этапах прогрессирования тяжести их состояния, а так же в течение 2–3 мес после окончания применения ЛФ. Из рис. 2 видно, что в течение всего срока введения ЛФ у животных с I и II стадией развития СД2 значения показателей глюкозы в крови и массы тела (рис. 2, а/а, б/б) существенно не про-

грессировали во времени, оставаясь близкими к тому уровню, на котором была начата терапия ЛФ. Введение ЛФ на I и II стадии способствовало длительному сохранению высокого уровня глюкозы в крови. ЛФ на III стадии развития СД2 также первоначально тормозил прогрессирующие изменения этих показателей, но к концу 1 мес терапии показатели глюкозы и массы тела резко снижались, а в скором времени (до окончания срока применения ЛФ) животные погибали. У мышей, получавших терапию ЛФ на I и II стадии СД2, значения показателей глюкозы в крови после прекращения поступления ЛФ в организм достоверно снижались и к 3 мес наблюдения стабилизировались на уровне 11,7 и 12,5 ммоль/л (рис. 2, а/а, б/б). При исследовании ПОМ в течение всего срока потребления ЛФ (рис. 2, в/в) было установлено, что начиная с 7 и до 21 дня поступления ЛФ в организм мышей на исходно разных стадиях развития СД2 (на I, II и III стадии) в тканях организма наступает резкое угнетение ОВП. Это выражается в снижении ПОМ, которое было отчётливым для мышей во всех подгруппах: в подгруппе 1 – ПОМ (в безразмерных единицах) снизился с 8,36 до 5,6; в подгруппе 2 – с 7,24 до 4,87; в подгруппе 3 – с 5,27 до 3,2. При дальнейшем поступлении ЛФ в организм мышей с СД2 в 1 и 2 подгруппах развивалось по-

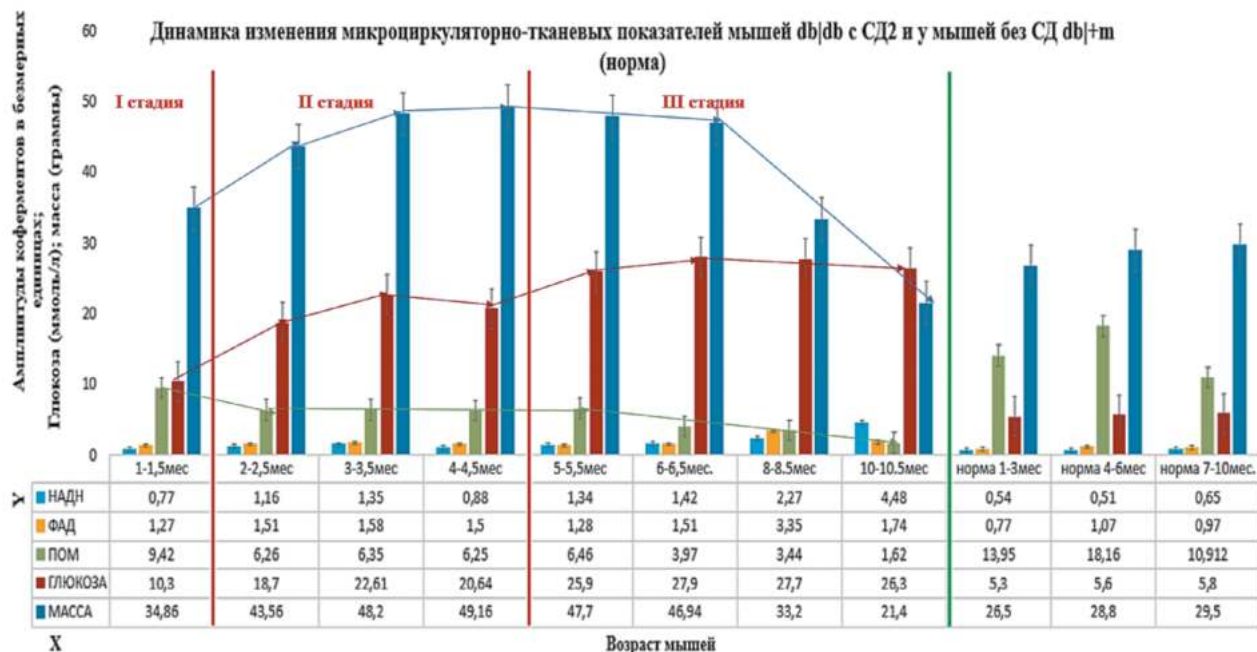


Рис. 1. Изменения глюкозы в крови, массы тела и микроциркуляторно-тканевых показателей у мышей db/db с СД2 и у мышей без СД db/+m (норма).

Fig. 1. Dynamics of changes in blood glucose, body weight and microcirculatory-tissue parameters in db/db mice with DM2 and in mice without diabetes db/+m (normal).

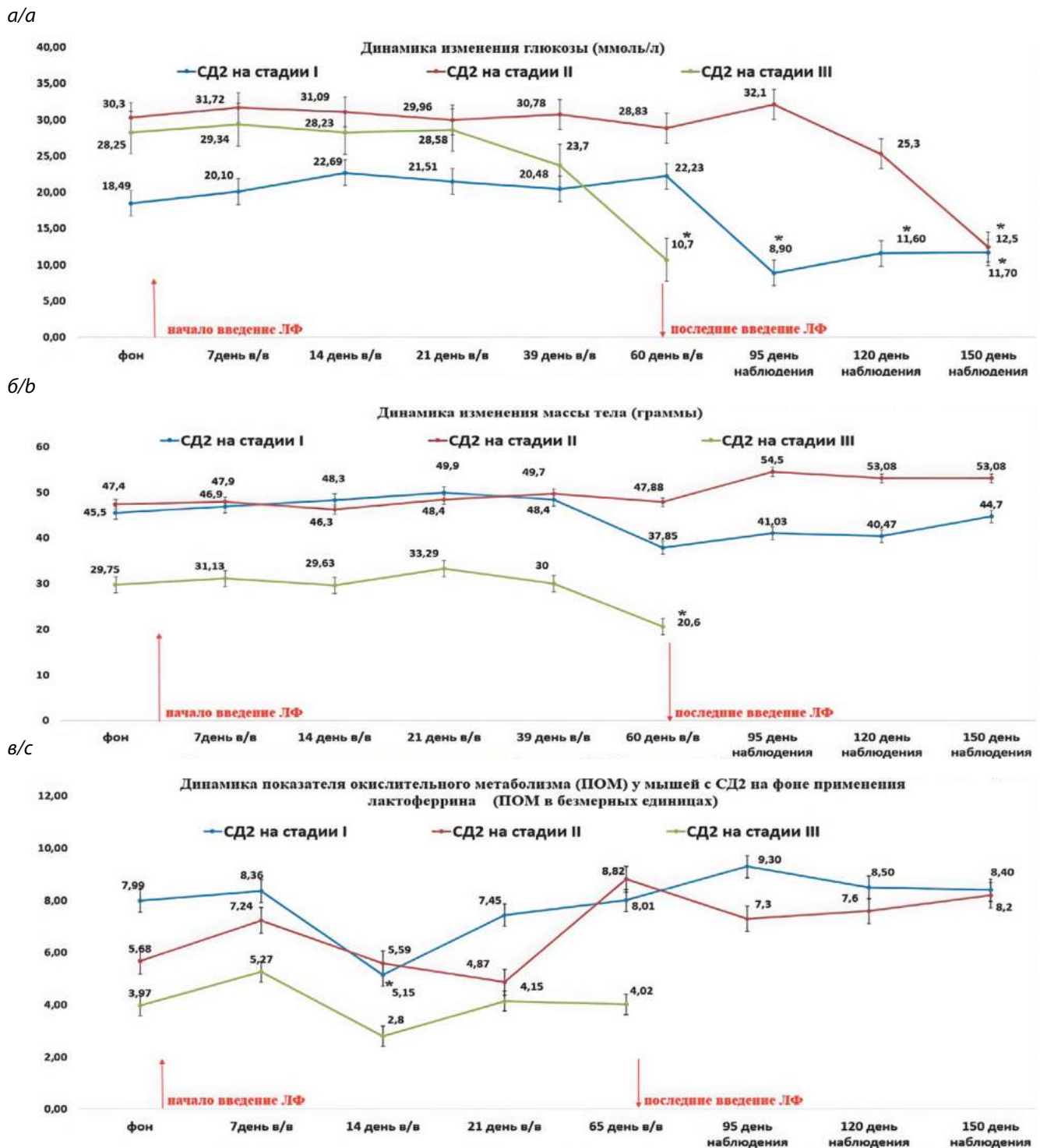


Рис. 2. Изменения метаболических показателей на фоне введения Лактоферрина на разных стадиях развития СД2 и после его отмены. а/а – глюкоза; б/б – масса тела; в/с – ПОМ (показатель окислительного метаболизма). * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем.
Fig. 2. Dynamics of changes in metabolic parameters during the administration of Lactoferrin at different stages of the development of T2DM and after its withdrawal. а/а – glucose; б/б – body weight; в/с – IOM (index of oxidative metabolism). * – $p < 0.05$ compared to the initial level.

степенное повышение ПОМ, который после отмены поступления Лф в организм стабилизировался и в течение последующих 3-х мес наблюдения поддерживался в подгруппах 1 и 2 на более высоком уровне, чем перед началом терапии Лф (рис. 2). ПОМ в подгруппе 1 исходно составлял 7,99, а через 3 мес после курсового применения Лф -8,4; в подгруппе 2 – ПОМ исходно составлял 5,68, а после терапии Лф – 8,2; в подгруппе 3 – ПОМ исходно был на низком уровне и составил 4,57, к концу применения ЛФ ПОМ составил 4,02, однако, уже к концу второго месяца применения Лф животные в подгруппе 3 – быстро погибали.

Таким образом, проведенное нами исследование динамики содержания глюкозы в крови, массы тела и состояния ОВП в тканях организма мышей в процессе применения Лф на разных этапах прогрессирующего развития СД2 позволило установить, что Лф, независимо от тяжести состояния животных, во всех подгруппах первоначально снижал интенсивность ОВП в тканях организма т.е. действовал как стресс-адаптирующий фактор.

Лф проявлял в организме мышей свойства адаптогена, т.к. на фоне снижения интенсивности ОВП в подгруппах 1 и 2 за счёт сохранившихся энергетических резервов и перестройки метаболизма в тканях тормозилось дальнейшее прогрессирование гликемии, и стабилизировалась масса тела. В подгруппе 3, однако, к концу срока применения Лф животные погибали, т.к. энергетические резервы у этих животных, находящихся на стадии декомпенсации, уже были истощены, а под воздействием Лф они быстро достигали критического уровня. Для подтверждения реализации стресс-адаптивных свойств Лф при применении его у животных с СД2 нами были изучены гистологические препараты ткани печени, активно участвующей в дисрегуляции углеводного и жирового обмена при СД2. На рис. 3 представлена гистологическая картина ткани печени мышей на разных стадиях прогрессирующего развития СД2 без и на 22-й день курсового применения Лф. Из рис. 3 видно, что на всех стадиях развития СД2 без применения Лф печень характеризуется наличием выраженной жировой дистрофии. На I стадии СД2, наряду с жировыми включениями в гепатоцитах, можно выявить некоторое количество двуядерных клеток. На II стадии СД2 в печени выявляются участки с гибелью большого количества печёночных клеток и замещением пустот каплями жира; двуядерные гепатоциты практически отсутствуют. В III терминальной стадии СД2 отмечается фокальный некроз гепатоцитов в периферической зоне печёночной доли и признаки пролиферации купферовских кле-

ток. В паренхиме отмечаются также единичные мелкие лимфогистиоцитарные узелки и выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация в периферической зоне, которые являются признаком воспалительного процесса в печени.

К 22 дню непрерывного применения Лф на I, II и III стадиях СД2 признаки повреждения ткани печени становились более выраженными. При введении Лф на I и II стадиях СД2 в печени выявлены обширные зоны дистрофии гепатоцитов с накоплением в них жира в виде многочисленных жировых капель разного размера и тенденцией их к слиянию в крупные жировые капли, ядра большинства гепатоцитов смещены к периферии. Выявлены участки с гибелью большого количества печёночных клеток и замещением пустот каплями жира. Двуядерных гепатоцитов выявлялось меньше, чем у животных, не получавших Лф. При введении Лф на III стадии СД2 дополнительно выявляется картина белковой (зернистой) дистрофии гепатоцитов, участки с фокальной жировой дистрофией и некротическими изменениями отдельных печёночных клеток с признаками кариорексиса. В периферической зоне печёночной доли отмечается также фокальный некроз гепатоцитов с признаками пролиферации купферовских клеток и слабая лимфогистиоцитарная инфильтрация. Таким образом, результаты исследования гистологических препаратов печени в период курсового применения Лф в совокупности с результатами исследования тканевого метаболизма позволяют признать, что Лф, развивая свою активность в организме, действует как стресс – адаптирующий фактор, который, снижая эффективность окислительных процессов в тканях, способствует усилению деструктивных процессов в них. Поскольку развитие осложнений при СД2, их тяжесть, а также обратимость при использовании адекватной терапии в значительной степени определяется состоянием клеток системы крови и костного мозга, поддерживающих адекватный уровень окислительно-восстановительных процессов в тканях, оказывающих иммунорегуляторное воздействие и участвующих в реализации регенераторных процессов, нами было изучено изменение, в этой системе – в период применения Лф и в течение 2–3 мес после его отмены.

3. Влияние ЛФ на состояние клеток крови на разных стадиях СД2. Результаты исследования состояния клеток крови при воздействии Лф представлены в таблице и на рис 4. В таблице приведены результаты исследования количественных характеристик, а также функциональных и физических свойств эритроцитов и тромбоцитов на фоне применения Лф в разные периоды развития СД2 и после его отмены.

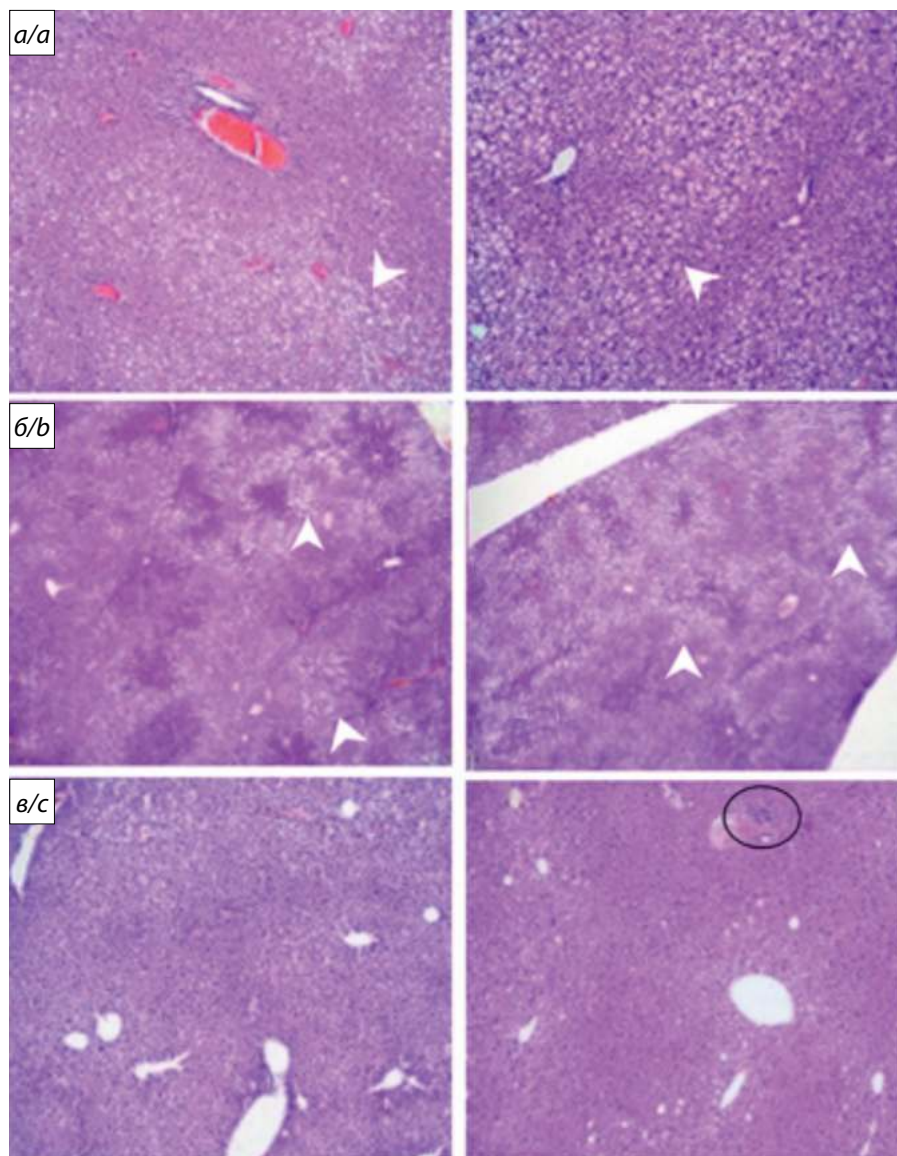


Рис. 3. Гистологическое состояние печени на трех этапах развития СД2 без и на фоне применения Лактоферрина (Лф). Окраска гематоксилин – эозин, увеличение 10×10: *a/a* – I стадия СД2; *a1/a1* – I стадия СД2 + Лф; *б/б* – II стадия СД2; *б1/б1* – II стадия СД2 + Лф; *в/с* – III стадия СД2; *в1/с1* – III стадия СД2 + Лф. Белые стрелки – участки ткани с жировой дистрофией, черный круг – лимфогистиоцитарная инфильтрация.

Fig. 3. Histological state of the liver at three stages of the development of DM2 without and with the use of Lactoferrin (Lf). Hematoxylin-eosin staining, magnification 10×10: *a/a* – Stage I DM2; *a1/a1* – stage I DM2 + LF; *б/б* – stage II DM2; *б1/б1* – stage II DM2 + LF; *в/с* – stage III DM2; *в1/с1* – stage III DM2 + LF.

Результаты, представленные в **таблице**, не позволили нам, однако, выявить чёткую закономерность адаптирующего воздействия Лф на все исследуемые параметры эритроцитов и тромбоцитов. Возможно, это обусловлено сохраняющимся повышенным диурезом и развивающимся изменением физических характеристик клеток крови, которые искажают истинные значения измеряемых показателей. Между тем, при исследовании общего количества лейкоцитов и процентного содержания отдельных популяций клеток в их составе (**рис. 4**) удастся в течение всего срока применения Лф на разных стадиях СД2 выявить влияние адаптирующего механизма действия Лф на лейкоциты крови. Так, в 1 и 2 подгруппах примене-

ние Лф на I и II стадиях СД2 способствовало дальнейшему снижению лейкопоза и усилению системной воспалительной реакции (по соотношению нейтрофилов и лимфоцитов), но после отмены Лф начиналось постепенное восстановление измеряемых показателей; однако, в 3 подгруппе при введении Лф на III стадии – отмена Лф сопровождалась ускоренной гибелью животных из-за полного истощения энергетических и регуляторных ресурсов в клетках организма при развитии стресс – адаптирующего эффекта Лф.

4. Влияние ЛФ на состояние клеток костного мозга на разных стадиях СД2. По современным представлениям адаптивная перестройка метаболизма

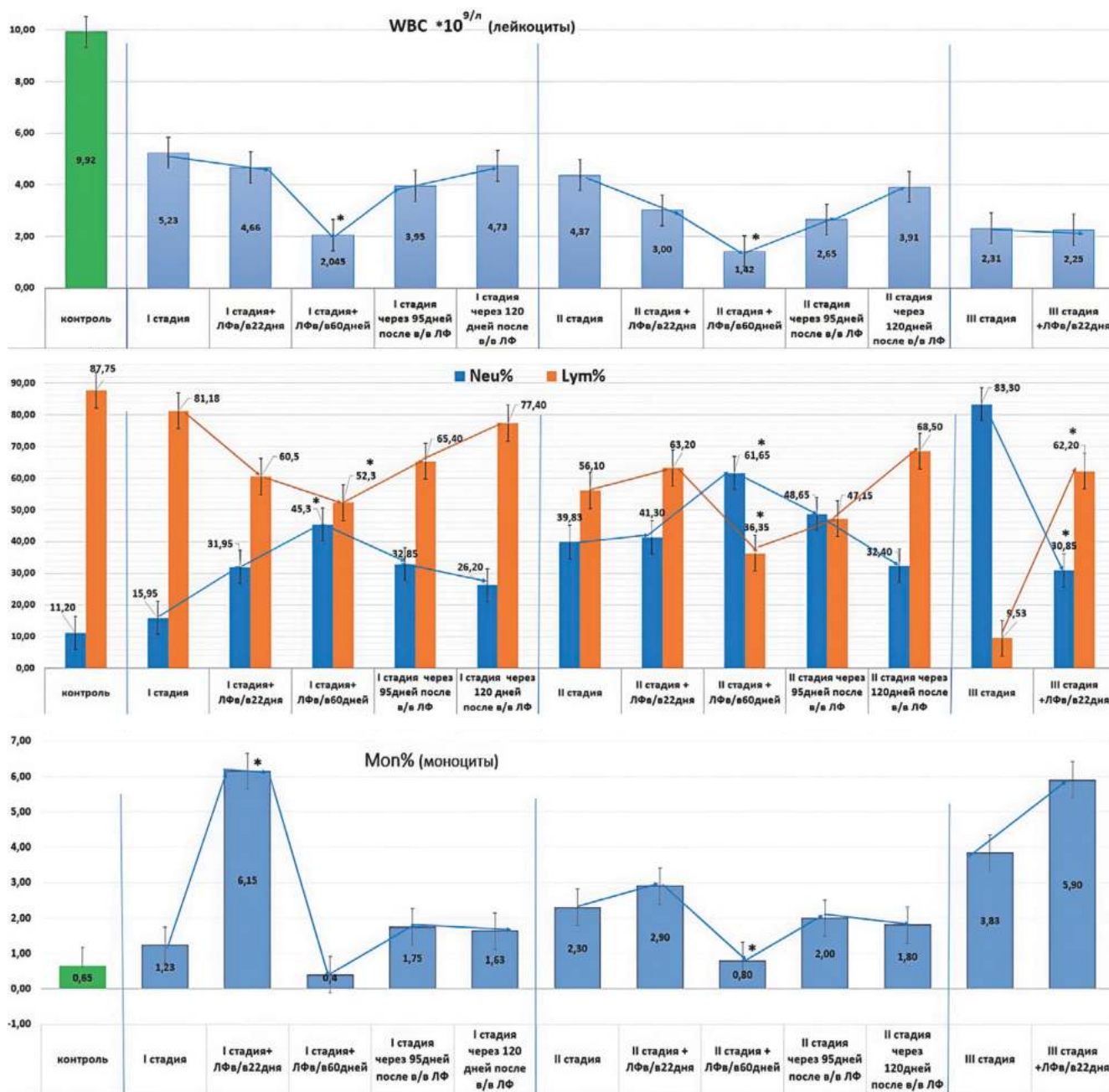


Рис. 4. Результаты динамического исследования состояния лейкоцитов крови на фоне применения Лф (через 22 и 60 дней) и после его отмены (95 и 120 день наблюдения).

* – $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем.

Fig. 4. Results of a dynamic study of the state of blood leukocytes during the use of Lf (after 22 and 60 days) and after its withdrawal (95 and 120 days of observation).

* – $p < 0.05$ compared to the initial level.

в тканях при различных повреждающих воздействиях начинается с активации в их клетках отдельных механизмов программируемой гибели, которые пре-

вращают клетки в секретомы, продуцирующие многочисленные паракринные факторы выживания [27]. Именно поэтому нами была проведена оценка цито-

Результаты динамического исследования состояния клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) у мышей линий db/+m (контроль) и db/db (модель СД2) после применения Лф (22 дня и 60 дней) на разных стадиях развития СД2 и после отмены Лф (через 95 и 120 дней от начала применения Лф).

The results of a dynamic study of the state of blood cells (erythrocytes and platelets) in db/+m (control) and db/db mice (DM2 model) after the use of Lf (22 days and 60 days) at different stages of the development of T2DM and after withdrawal of Lf (after 95 and 120 days from the start of Lf use).

Показатели	db/+m	db/db (СД2)											
		I стадия+Лф (период адаптации)					II стадия+Лф (период прогрессирующей дезадаптации)					III стадия+Лф (период декомпенсации)	
		День					День						
		исх	22	60	95	120	Исх	22	60	95	120	Исх	22 Дня
RBC 10 ¹² /л	8,68	7,5	8,64	8,0	8,145	8,22	7,73	8,18	7,92	7,17	7,5	8,78	7,72
HGB г/л	157,5	132,25	154,5	156	155,5	156	147,3	158	148,5	136	144	167,7	144,5
HCT%	40,75	39,15	43,55	39,4	44,2	42,2	40,8	43,4	41,95	37,8	41,3	46,25	42,4
MCV (fl)	46,95	52,15	50,45	49,2	54,3	51,4	52,8	53,1	52,95	52,8	53,1	52,67	54,9
MCH (pg)	18,1	17,6	17,85	19,5	19,1	18,1	19,07	19,4	18,8	18,95	19,1	19,07	18,7
MCHC г/л	386	337,25	354,5	395,5	352,5	348,5	361	365	354	359,5	362,1	362,3	340,5
RDW-CV%	15,35	18,43	19,45	14	16,8	15,6	17,53	15,2	16,95	16,05	15,9	18,5	16,95
PLT 10 ⁹ /л	881	898	820	803	935,5	890,5	753	728	896,5	911,5	880	977	877,0
MPV (fl)	6,7	6,85	7,1	6,2	6,15	6,9	6,33	6,05	5,85	5,9	6,1	7,1	6,2
PDW%	6,5	6,23	6,8	5,7	6,2	6,3	7,2	5,7	5,2	6,2	6,6	9,13	6,7
PCT%	0,59	0,61	0,58	0,498	0,57	0,6	0,48	0,44	0,52	0,54	0,5	0,69	0,54

Примечание. fl – в фемтолитрах; pg – в пикограммах.

Note. Designations: fl – in femtoliters; pg – in pictograms.

метрических характеристик программируемой гибели клеток костного мозга (ККМ) под влиянием курсового применения Лф на разных стадиях прогрессирующего развития СД2. Общее количество клеток костного мозга у мышей с терминальной стадией снижалось на порядок и более (0,03 — 0,12×10⁷ клеток на 1 бедренную кость) по сравнению с контрольными животными (гетерозиготами) того же возраста (6-10 мес), у которых оно было ~1,3×10⁷ клеток на 1 бедренную кость. Значимых различий в количестве клеток костного мозга на начальной и выраженной стадиях по сравнению с контрольными (гетерозиготными) животными того же возраста (2 мес и 4-6 мес соответственно) мы не обнаружили. Количество клеток у этих животных колебалось в диапазоне от 1,0×10⁷ до 1,6×10⁷ на 1 бедренную кость. Из рис. 5 видно, что Лф при непрерывном применении в течение 22 дней способствовал снижению процентного содержания живых клеток на I и II стадиях развития СД2 и повышению процентного содержания клеток в состоянии апонекроза.

Однако, после отмены Лф (через 22 дня применения) на фоне продолжающегося снижения живых клеток к 68 суткам происходило отчётливое повышение процентного содержания клеток в состоянии апонекроза

по сравнению с контролем. У животных с III стадией СД2 (стадия декомпенсации) применение Лф в течение 22 дней резко повышало количество живых клеток в костном мозге с 53,7% до 77,3%, но снижало количество клеток как в состоянии апонекроза с 25,14% до 13,5%, так и апоптоза с 10,96% до 1,59% (рис. 5, в/с). Отмена Лф в течение 68 дней после 22 дней его применения приводила у этих животных к снижению живых клеток до 70,1% и повышению доли апоптотических клеток до 13,5%. Мы полагаем, что результаты оценки цитометрических показателей клеток костного мозга на фоне применения Лф позволяют выявить степень выраженности сохранившихся в организме адаптационных резервов на разных стадиях СД2 по суммарному процентному содержанию в костном мозге повреждённых клеток: на I стадии эти клетки составили 39,5%, на II стадии – 35,3%, а на III – 22,6%. После отмены Лф количество повреждённых клеток на I стадии повысилось до 42,5%, на II стадии – до 37,9%, а на III стадии – до 29,9%. Таким образом, курсовое введение Лф в организм на всех этапах развития СД2 выявляет не только его стресс-адаптирующие свойства, но и выявляет адаптивные резервы организма, уровень которых предопределяет выраженность терапевтического эффекта ЛФ на разных стадиях развития СД2.

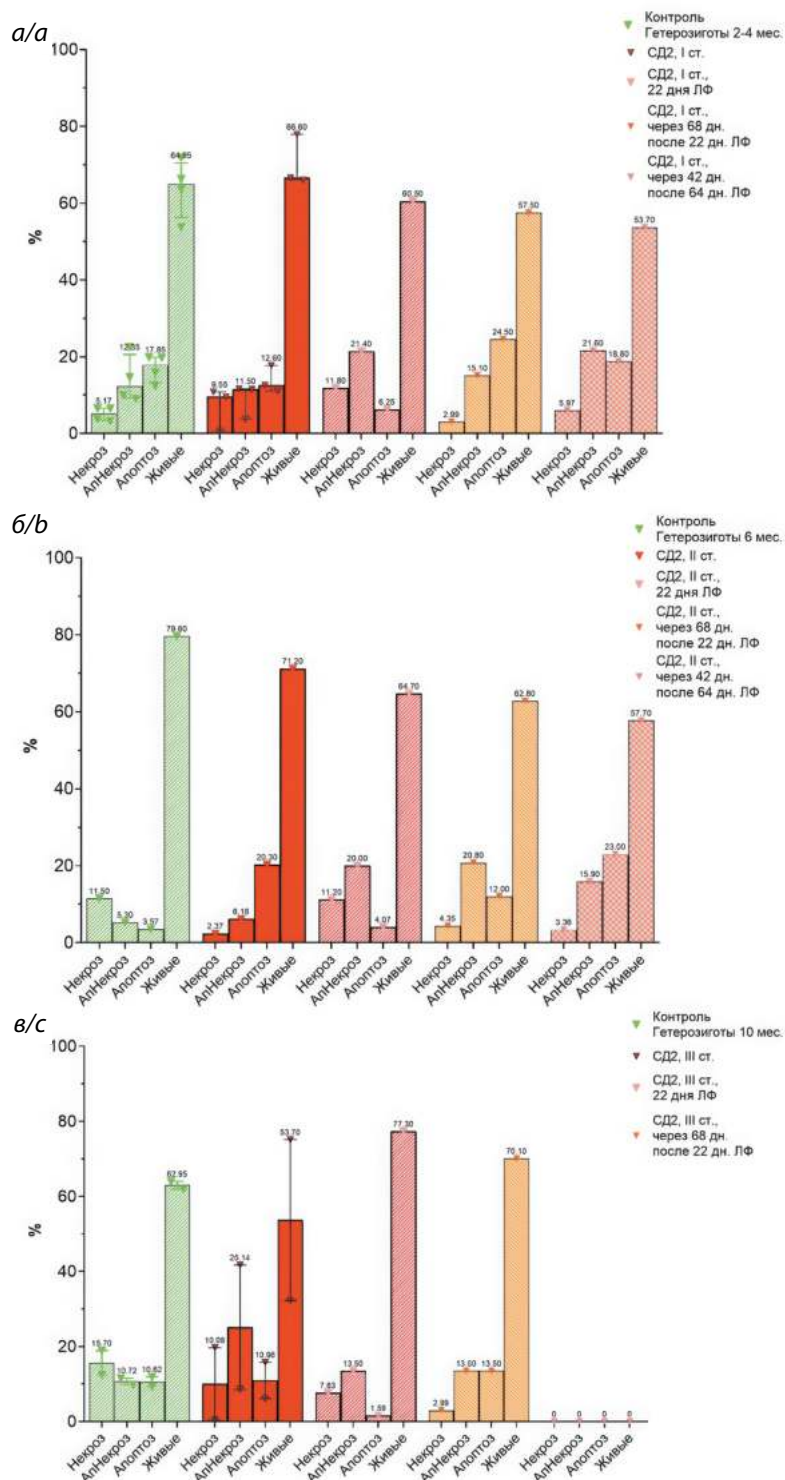


Рис. 5. Состав клеток костного мозга до и после применения ЛФ на разных стадиях развития СД 2: *а/а* – I стадия, *б/б* – II стадия, *в/в* – III стадия.
Fig. 5. Composition of bone marrow cells before and after the use of LF at different stages of development of type 2 diabetes: *а/а* – stage I, *б/б* – stage II, *в/в* – stage III.

Обсуждение

Приступая к изучению терапевтических возможностей Лф, при СД2 мы обратили внимание на его благоприятные эффекты не только при СД2 [11, 13], но и при различных других патологиях — респираторных заболеваниях, сепсисе, анемии, неонатальных некротизирующих колитах и др. [7, 15]. Наряду с преимущественно позитивной оценкой влияния Лф на метаболизм глюкозы и липидов при СД2 (снижение гликемии и липидемии), встречаются работы, в которых регуляторное воздействие Лф на эти показатели при СД2 не подтвердилось [15, 28]. Это позволило нам предположить, что Лф оказывает на организм неспецифическое регуляторное воздействие и что выявленные различия в действии Лф при СД2 могут быть обусловлены применением его разных доз, способов и сроков введения в организм, а также различной степенью тяжести (стадией) заболевания, на которой применялся Лф. Для определения влияния степени тяжести метаболических нарушений в организме при СД2 на реализацию терапевтических эффектов Лф нами было выполнено настоящее исследование. Стадии прогрессирующего развития СД2 были выявлены нами путём регистрации гликемии, веса и ПОМ в опытах на мышах db/db без применения Лф и представлены на **рис. 1**. Из **рис. 2 а/а, б/б** видно, что динамика уровня гликемии и массы тела при введении Лф на I и II стадии СД2 стабилизировалась, т.е. не претерпела существенных изменений в течение всего срока введения Лф, но прекращение поступления Лф в организм способствовало отчётливому снижению уровня гликемии и стабилизации веса животных в течение 3 последующих месяцев. Введение Лф на III стадии СД2 сначала тормозило нарастание уровня гликемии и массы тела, но затем показатель гликемии резко снижался, постепенно снижалась масса тела и животные погибали уже в конце периода применения Лф. При оценке ПОМ (**рис. 2 в/в**) мы отметили, что именно в период непрерывного и длительного поступления Лф в организм наступало снижение этого показателя, особенно выраженное в I и II подгруппах. После отмены Лф ПОМ в I и II подгруппах постепенно восстанавливался и становился даже выше исходного уровня. Между тем, в III подгруппе животных, где ПОМ был уже исходно на низком уровне, этот показатель под воздействием Лф продолжал снижаться, способствуя ранней гибели животных. Аналогичная закономерность была выявлена нами при изучении влияния Лф в I, II и III подгруппах на состояние клеток крови и костного мозга. В крови в I и II подгруппах отмечено нарастающее торможение лейкопоэза и активация его после отмены Лф (**см. табл., рис. 4**); в костном мозге — нарастающее сниже-

ние количества живых клеток после 22 дней применения Лф и увеличение количества повреждённых (апоптотических) клеток (**рис. 5**) после отмены Лф. В III подгруппе также активизировались механизмы срочной адаптации, но они были не эффективны и животные погибали.

Полученные результаты курсового воздействия Лф на организм в терапевтической дозе [15] не явились для нас неожиданными, т.к. они полностью укладываются в современные представления о клеточных механизмах формирования срочной защиты органов. Эти механизмы действуют в рамках активизации эволюционно выработанного неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем [29], в котором активную роль играют механизмы программируемой гибели клеток [27], в том числе, как мы показали, и клеток костного мозга. Показано, что именно активация этого синдрома обеспечивает клеточный гомеостаз, но на сниженном уровне (снижение ПОМ), и поддерживается энергетически за счёт активации гликолиза [30]. Очевидно, на этапе применения Лф именно за счёт усиления гликолиза в клетках организма, уровень гликемии и был стабилизирован. Дополнительным подтверждением активации механизмов программируемой гибели клеток при формировании срочной защиты органов при воздействии медикаментозных препаратов могут служить многочисленные работы последних лет об активации в них процессов клеточной аутофагии [31]. Результаты гистологического исследования печени также подтверждают стресс-адаптирующее воздействие Лф на этапе его курсового применения, т.к. Лф усиливал в печени деструктивные процессы — способствовал усилению жировой дистрофии и усиливал в ней воспалительный процесс, который, как полагают, является ведущим фактором развития инсулинорезистентности [15]. Проведенное нами исследование подтверждает эффективность использования Лф для коррекции гликемии и ОВП при СД2, которая развивается в организме вслед за эффективной реализацией адаптационного синдрома. Вместе с тем, проведенное исследование указывает на целесообразность применения Лф только у пациентов с ещё сохранившимся уровнем адаптационных резервов в организме, т.к. даже у таких пациентов длительное курсовое применение Лф может оказать неблагоприятное воздействие на клинический статус в период развития адаптационного синдрома.

Выводы:

1. Лф в виде 1% питьевого раствора в период курсового применения на всех стадиях развития СД2 действует на клеточном и тканевом уровне как мощный адаптоген, что проявляется выраженным снижением

ем уровня окислительно-восстановительных процессов в тканях, усугублением деструктивных процессов в печени и торможением процессов гемопоэза с участием механизмов программируемой гибели клеток.

2. На ранних стадиях развития СД2 (стадия адаптации и прогрессирующей дезадаптации) Лф стабилизирует значения показателей гликемии и веса животных; прекращение поступления Лф в организм спонтанно снижает уровень гликемии и стабилизирует вес животных; на поздней стадии развития СД2 (стадия декомпенсации) Лф уже в конце курсового применения способствует резкому повышению и быстрому снижению гликемии, ведёт к прогрессирующему снижению веса и гибели животных.

3. Курсовое применение Лф на всех стадиях развития СД2 оказывает стресс-адаптивное воздействие на клетки лейкоцитарной формулы крови: развивается дальнейшее снижение общего количества лейкоцитов, повышение процентного содержания нейтрофилов и снижение процентного содержания лимфоцитов; после отмены Лф, использованного на ранних стадиях СД2, процесс кроветворения начинает медленно восстанавливаться.

4. На всех стадиях СД2 Лф оказывает стресс-адаптивное воздействие на состояние клеток костного мозга путём активации в них регуляторных механизмов программируемой гибели с развитием апонекроза и апоптоза: на ранних стадиях применение Лф и его отмена способствуют снижению процентного содержания живых клеток и выраженному повышению клеток в состоянии апонекроза и апоптоза; на поздней стадии СД2 применение Лф и его отмена характеризуются более низким процентным содержанием в костном мозге клеток в состоянии программируемой гибели (некроз, апонекроз и апоптоз), чем при использовании и отмене Лф на ранних стадиях СД2.

5. Курсовое применение Лф для коррекции клинических проявлений СД2 может оказаться целесообразным на ранних (ауторегулируемых) стадиях развития болезни (I и II стадии) и должно осуществляться под контролем информационных лабораторно-клинических показателей (уровень гликемии, лейкоцитарная формула крови и др.).

Литература

(п.п. 1–23; 25–28; 31 см. References)

24. Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флоуметрии *Патологическая физиология экспериментальная терапия* 2023; 67(2): 118–29. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129>

29. Браун А.Д., Мозженок Т.П. *Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы*. Л.: Изд. дом «Наука», 1988.

30. Онищенко Н.А. Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами как универсальная фаза формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. *Патологическая физиология экспериментальная терапия*. 2016; 60(4): 148–53.

References

- Viigimaa M., Sachinidis M., Toumpourleka M., Koutsampasopoulos K., Alliksoo S., Titma T. Macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2020; 18(2): 110–6. <https://doi.org/10.2174/1570161117666190405165151>
- Hossan T., Kundu S., Alam S.S., Nagarajan S. Epigenetic modifications associated with the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2019; 19(6): 775–86. <https://doi.org/10.2174/18715303119666190301145545>
- Alamri B.N., Bahabri A., Aldereihim A.A., Alabdijabbar M., Alsubaie M.M., Alnaqeb D., et al. Hyperglycemia effect on red cells indices. *Eur. Rev. Med. Pharmacol Sci.* 2019; 23: 2139–50. https://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17259
- Malandrino N., Wu W.C., Taveira T.H., Whitlatch H.B., Smith R.J. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55: 226–35.
- Henning R.J. Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2018; 14(6): 491–509. <https://doi.org/10.2217/fca-2018-0045>
- Hosseini M.S., Rostami Z., Saadat A., Saadatmand S.M., Naemi E. Anemia and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nephrourol Mon.* 2014; 6(4): e19976. <https://doi.org/10.5812/numonthly.19976>
- Alexander D.B., Iigo M., Yamauchi K., Suzui M., Tsuda H. Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem Cell Biol.* 2012; 90(3): 279–306. <https://doi.org/10.1139/o2012-013>
- Legrand D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem Cell Biol.* 2012; 90(3): 252–68. <https://doi.org/10.1139/o11-056>
- Kanwar J.R., Roy K., Patel Y., Zhou S.F., Singh M.R., Singh D., et al. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions *Molecules*. 2015; 20(6): 9703–31. <https://doi.org/10.3390/molecules20069703>
- García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1820(3): 226–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018>
- Levay P.F., Viljoen M. Lactoferrin: a general review *Haematologica*. 1995; 80(3): 252–67. PMID: 7672721
- Moreno-Navarrete J.M., Ortega F.J., Bassols J., Ricart W., Fernández-Real J.M. Decreased circulating lactoferrin in insulin resistance and altered glucose tolerance as a possible marker of neutrophil dysfunction in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 4036–44. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0215>
- Mohamed W.A., Schaalman M.F. Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic pediatrics; controlling impact on PPAR-γ, SIRT-1, and TLR4 downstream signaling pathway. *Diabetol Metab Syndr.* 2018; 4(10): 89. <https://doi.org/10.1186/s13098-018-0390-x>

14. Ling C.J., Xu J.Y., Li Y.H., Tong X., Yang H.H., Yang J., et al. Lactoferrin promotes bile acid metabolism and reduces hepatic cholesterol deposition by inhibiting the farnesoid X receptor (FXR)-mediated enterohepatic axis. *Food Funct.* 2019; 10(11): 7299-7307. <https://doi.org/10.1039/c9fo01616c>
15. Ianiro G., Niro A., Rosa L., Valenti P., Musci G., Cutone A. To boost or to reset: the role of lactoferrin in energy metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24: 15925. <https://doi.org/10.3390/ijms242115925>
16. Kanwar J.R., Roy K., Patel Y., Zhou S.F., Singh M.R., Singh D., et al. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedical approaches to enhance its bioactive functions. *Molecules.* 2015; 20(6): 9703-31. <https://doi.org/10.3390/molecules20069703>
17. Wang X., Yue L., Dang L., Yang J., Chen Z., Wang X., et al. Role of sialylated glycans on bovine lactoferrin against influenza virus. *Glycoconj. J.* 2021; 38(6): 689-696. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10029-5>
18. Derosa G., Angelo A., Maffioli P. Change of some oxidative stress parameters after supplementation with whey protein isolate in patients with type 2 diabetes. *Nutrition.* 2020; 73: 110700. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110700>
19. Moreno-Navarrete J.M., Ortega F.J., Bassols J., Castro A., Ricart W., Fernandez-Real J.M. Association of circulating lactoferrin concentration and 2 nonsynonymous LTF gene polymorphisms with dyslipidemia in men depends on glucose-tolerance status. *Clin. Chem.* 2008; 54(2): 301-9. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.095943>
20. Moreno-Navarrete J.M., Ortega F.J., Bassols J., Ricart W., Fernandez-Real J.M. Decreased circulating lactoferrin in insulin resistance and altered glucose tolerance as a possible marker of neutrophil dysfunction in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(10): 4036-44. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0215>
21. Mohamed W.A., Schaalan M.F. Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic pediatric; controlling impact on PPAR- γ , SIRT-1 and TLR4 downstream signaling pathway. *Diabetol Metab Syndr.* 2018; 10: 89. <https://doi.org/10.1186/s13098-018-0390-x>
22. Ling C.J., Xu J.Y., Li Y.H., Tong X., Yang H.H., Yang J., et al. Lactoferrin promotes bile acid metabolism and reduces hepatic cholesterol deposition by inhibiting the farnesoid X receptor (FXR)-mediated enterohepatic axis. *Food Funct.* 2019; 10(11): 7299-307. <https://doi.org/10.1039/c9fo01616c>
23. Du Y., Li D., Chen J., Li Y.H., Zhang Z., Hidayat Kh., et al. Lactoferrin improves hepatic insulin resistance and pancreatic dysfunction in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *Nutrition Research.* 2022; 103: 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2022.03.011>
24. Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2023; 67(2): 118-29. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129> (in Russian)
25. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J Vis Exp.* 2016; 14(110): 53936. <https://doi.org/10.3791/53936>
26. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., Waterhouse N.J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016; 2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
27. Beer L., Mildner M., Gyongyosi M., Ankersmit H.J. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis.* 2016; 21: 1336-53. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1292-8>
28. Ling C.J., Min Q.Q., Yang J.R., Zang Z., Yang H.H., Xu J.Y., et al. Lactoferrin alleviates the progression of atherosclerosis in ApoE(-/-) mice fed with high-fat/cholesterol diet through cholesterol homeostasis. *J. Med Food.* 2019; 22(10): 1-9. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.4389>
29. Braun A.D., Mozejnok T.P. *Nonspecific adaptive syndrome of cellular system. [Nespetsificheskii adaptatsionnyi sindrom kletochnoi sistemy].* Leningrad: Publ. House, «Nauka»; 1988. (in Russian)
30. Onishchenko N.A. Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(4): 148-53. (in Russian)
31. Lin C.W., Chen Y.S., Lin C.C., Chen Y.J., Lee P.H., Kuo P.L., et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep.* 2015; 5: 15807. <https://doi.org/10.1038/srep15807>

Сведения об авторах:

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП»;

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

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

Черепов Антон Борисович, науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП»;

Метёлкин Аркадий Андреевич, мл. науч. сотр., отд. молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП»;

Онищенко Нина Андреевна, доктор мед. наук, проф., гл. специалист отд. подготовки научных и медицинских кадров, ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Никольская Алла Олеговна, канд. биол. наук, лаборант-исследователь, отд. биомедицинских технологий и тканевой инженерии, ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Степанова Ольга Ивановна, канд. биол. наук, зав. лаб. № 5 ФГБУН НЦБМТ ФМБА России;

Клёсов Роман Алексеевич, науч. сотр., лаб. № 5 ФГБУН НЦБМТ ФМБА России;

Семёнов Хызыр Хыйсаевич, канд. биол. наук, зав. лаб. № 10 ФГБУН НЦБМТ ФМБА России;

Проценко Алексей Николаевич, канд. мед. наук, доцент, каф. дерматовенерологии им. акад. Ю.К. Скрипкина ИКМ ФГАОУ ВО «РНМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Нестеренко Михаил Владимирович, доктор биол. наук, науч. руководитель проекта ООО «Лактобио»;

Басок Юлия Борисовна, доктор мед. наук, зав. отд. биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2025

УДК 577.25

Пукаева Н.Е.^{1,2}, Кухарская О.А.^{1,2}, Иванова Т.В.², Наздрачева М.Р.², Бурак М.В.², Попов А.А.²,
Овчинников Р.К.^{1,2}, Антохин А.И.², Московцев А.А.^{2,3}, Кухарский М.С.^{1,2}

Агрегация мутантной формы белка альфа-синуклеина α -Syn A53T в клетках нейронального типа SH-SY5Y: валидация модели

¹«Институт физиологически активных веществ» Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, 142432, Московская область, Черноголовка, Северный проезд, д. 1;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 127994, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Введение. Общим патогенетическим событием при развитии нейродегенеративных заболеваний является агрегация специфических белков в нервной системе. Агрегация белка α -синуклеина обнаруживается при болезни Паркинсона (БП), деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии и др. Исходя из этого, основным направлением поиска потенциальной терапии является разработка препаратов с антиагрегационными свойствами, которые способны предотвращать образование агрегатов, либо способствовать разрушению уже сформированных отложений, и таким образом, приостанавливать развитие патологического процесса. Для поиска и отбора таких препаратов необходимо использовать относительно простые и легко воспроизводимые тест-системы, в которых можно проверять их эффективность. Удобным инструментом для этих целей могут служить клеточные линии, экспрессирующие патогенные формы белков человека, связанные с развитием заболеваний. **Цель.** Получение и характеристика клеточной модели агрегации α -синуклеина человека на основе генетического конструктора с патогенной мутацией A53T, ассоциированной с семейной формой БП.

Методика. Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y трансфицировали плазмидным вектором, кодирующим α -синуклеин с мутацией A53T. Агрегацию белка стимулировали обработкой ингибитором протеасом MG132. Анализ проводили методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии после иммуноцитохимического окрашивания белка в клетках. Для валидации модели была проведена оценка действия соединения – артемизинина, на развитие агрегации.

Результаты. Получена и охарактеризована модель агрегации α -синуклеина в клетках нейрональной линии человека, в которой воспроизводятся основные молекулярно-клеточные признаки характерные для синуклеинопатии. В клетках формировались белковые отложения нескольких морфологических типов, отражающих различные этапы агрегации. Ингибирование функции убиквитин-протеасомной системы приводило к значительному усилению агрегации и клеточной гибели. Соединение артемизинин, обладающее нейропротекторными свойствами, снижало общее число клеток с агрегатами, ингибируя накопление ранних продуктов агрегации.

Заключение. Полученная модельная система может быть использована для направленного поиска нейропротекторных препаратов, способных эффективно блокировать патологическую агрегацию α -синуклеина.

Ключевые слова: агрегация белков; альфа-синуклеин; синуклеинопатии; клеточная модель; нейродегенеративные заболевания; тестирование химических соединений; антиагрегационный эффект

Для цитирования: Пукаева Н.Е., Кухарская О.А., Иванова Т.В., Наздрачева М.Р., Бурак М.В., Попов А.А., Овчинников Р.К., Антохин А.И., Московцев А.А., Кухарский М.С. Агрегация мутантной формы белка альфа-синуклеина α -Syn A53T в клетках нейронального типа SH-SY5Y: валидация модели. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 29–41.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.29-41

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Пукаева Н.Е., Кухарский М.С.; сбор и обработка материала – Кухарская О.А., Попов А.А.; подготовка иллюстративного материала – Наздрачева М.Р., Бурак М.В.; статистическая обработка материала – Иванова Т.В.; написание текста – Овчинников Р.К., Кухарский М.С.; редактирование – Московцев А.А., Антохин А.И., Кухарский М.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кухарский Михаил Сергеевич, e-mail: kukharskym@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН 2024 года (тема № FFSG-2024-0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.12.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Pukaeva N.E.^{1,2}, Kukharskaya O.A.^{1,2}, Ivanova T.V.², Nazdracheva M.R.², Burak M.V.², Popov A.A.², Ovchinnikov R.K.^{1,2}, Antokhin A.I.², Moskovtsev A.A.^{2,3}, Kukharsky M.S.^{1,2}

Aggregation of the mutant alpha-synuclein protein (α -Syn A53T) in SH-SY5Y neuronal cells: model validation

¹Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Severnyy proezd, 1, Chernogolovka, 142432, Russian Federation;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianova Str. 1, Moscow 127994, Russian Federation;

³Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Introduction. A common pathogenic event in the development of neurodegenerative diseases is the aggregation of specific proteins in the nervous system. The aggregation of α -synuclein protein is observed in Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and other disorders. Based on this, a key direction in the search for potential therapies is the development of anti-aggregation compounds that can prevent aggregate formation or promote the breakdown of existing deposits, thereby halting the progression of the pathological process. To identify and screen such compounds, relatively simple and reproducible test systems are required to assess their efficacy. Cell lines expressing pathogenic forms of human proteins associated with disease development serve as a convenient tool for these purposes.

Objective. To generate and characterize a cellular model of human α -synuclein aggregation based on a genetic construct carrying the pathogenic A53T mutation, which is associated with familial forms of PD.

Methods. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were transfected with a plasmid vector encoding α -synuclein with the A53T mutation, associated with hereditary forms of PD. Protein aggregation was induced by treatment with the proteasome inhibitor MG132. The analysis was performed using fluorescence and confocal microscopy following immunocytochemical staining of the protein in cells. To validate the model, the effect of the neuroprotective compound artemisinin on aggregation dynamics was assessed.

Results. A model of α -synuclein aggregation was established and characterized in human neuronal cells, recapitulating key molecular and cellular features characteristic of synucleinopathies. Protein deposits of various morphological types were formed in the cells, reflecting different stages of aggregation. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system function led to a significant increase in aggregation and cell death. The compound artemisinin, known for its neuroprotective properties, reduced the overall number of cells with aggregates by inhibiting the accumulation of early aggregation products.

Conclusion. The developed model system can be utilized for targeted screening of neuroprotective drugs capable of effectively blocking pathological α -synuclein aggregation.

Keywords: protein aggregation; α -synuclein; synucleinopathies; cellular model; neurodegenerative diseases; compound screening; anti-aggregation effect

For citation: Pukaeva N.E., Kukharskaya O.A., Ivanova T.V., Nazdracheva M.R., Burak M.V., Popov A.A., Ovchinnikov R.K., Antokhin A.I., Moskovtsev A.A., Kukharsky M.S. Aggregation of the mutant alpha-synuclein protein (α -Syn A53T) in SH-SY5Y neuronal cells: model validation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 29–41. (in Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.29-41

Author's contribution: concept and study design – Pukaeva N.E., Kukharsky M.S.; data collection and processing – Kukharskaya O.A., Popov A.A.; preparation of illustrative material – Nazdracheva M.R., Burak M.V.; statistical data analysis – Ivanova T.V.; manuscript writing – Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S.; editing – Moskovtsev A.A., Antokhin A.I., Kukharsky M.S. Final article approval and responsibility for the integrity of all sections – all co-authors.

For correspondence: **Michail S. Kukharsky**, Doctor Biol. Sc., Head of the Laboratory of Molecular-Genetic Mechanisms of Neurodegeneration, Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, e-mail: kukharskym@mail.ru

Information about the authors:

Pukaeva N.E., <https://orcid.org/0009-0004-4894-8068>

Kukharskaya O.A., <https://orcid.org/0000-0003-3015-6447>

Ovchinnikov R.K., <https://orcid.org/0009-0002-9426-4551>

Kukharsky M.S., <https://orcid.org/0000-0001-5080-2544>

Funding. This research was funded by the budget of the IPAC RAS State Target (№FFSG-2024-0023).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Received 16.12.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Альфа-синуклеин (α -synuclein) – небольшой (14 кДа) белок из 140 аминокислот, кодируемый геном *SNCA*, экспрессирующийся в нейронах центральной и периферической нервной системы, а также в клетках крови и других тканях [1, 2]. Долгое время считалось, что данный белок существует в клетках в «нативно развернутой» форме в виде мономера и приобретает свою устойчивую конформацию только при взаимодействии с мембраной везикул [3, 4]. Позднее было продемонстрировано, что эндогенный α -синуклеин в физиологических условиях представляет собой свернутый тетрамер с массой около 58 кДа, который не склонен, в отличие от мономера, образовывать амилоидоподобные агрегаты [5]. Дисбаланс в соотношении тетрамер/мономер может приводить к накоплению промежуточных олигомеров, далее зрелых фибрилл и развитию синуклеинопатий. Одной из форм синуклеинопатий является болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание [6]. В нервной системе пациентов с БП наблюдается накопление характерных отложений, содержащих α -синуклеин: в соме нейронов – телец Леви, в аксонах – нейритов Леви [7–10]. Генетические исследования показали, что миссенс-мутации (A18T, A29S, A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E) в гене *SNCA* связаны с развитием семейных форм БП и деменции с тельцами Леви [11–14]. Мутация A53T – замена 53 аминокислоты с аланина на треонин, усиливает агрегационные свойства белка и способствует его токсическому действию на нервные клетки и синапсы [14–16].

Многочисленные исследования показали, что накопление α -синуклеина в мономерной или олигомерной форме может вызывать стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресс) [17–19], что приводит к нарушению белкового гомеостаза (протеостаза) в клетке [20, 21]. В качестве дополнительных механизмов токсичности α -синуклеина выделяют нарушение везикулярного экзоцитоза и высвобождения нейротрансмиттеров [22–24], изменение динамики цитоскелета [25, 26], нарушение обмена кальция [27, 28], дисфункцию митохондрий [29–31], окислительный стресс [32] и т.д.

Убиквитин-протеасомная система (УПС) является основным путем деградации α -синуклеина в нормальных физиологических условиях [33], тогда как при накоплении аномальных форм белка она может быть уже не эффективна для его удаления из клетки и при этом подключается аутофаголизосомная система (АЛС) деградации [34]. Патологические формы α -синуклеина

нарушают функции УПС и АЛС и способствуют гибели нервных клеток [35, 36]. Экспрессия мутантного α -синуклеина A53T в дофаминергических клетках феохромоцитомы крысы PC12 вызывала снижение протеасомной активности и накопление в клетках аутофагосомных везикулярных структур [37]. Доставка мутантного α -синуклеина в черную субстанцию крыс с помощью аденоассоциированного вирусного вектора также приводила к нарушению каталитической функции 26S протеасомы, причем эти события предшествовали развитию клинических признаков заболевания [38]. Еще одним подтверждением важной роли систем поддержания белкового гомеостаза в клетке в патогенезе БП является тот факт, что мутации в генах, участвующих в работе УПС (*PRKN2*, *UCHL1*), ассоциированы с БП [39]. Нокдаун деубиквитиназы *USP9X* в клетках SH-SY5Y способствовал накоплению моноубиквитинированных форм α -синуклеина и усиливал образование токсичных включений α -синуклеина [40]. Таким образом, появление в клетке патогенных форм α -синуклеина с одной стороны, и нарушение функций систем деградации таких белков с другой стороны, способны взаимно усиливать друг друга и приводить к неуклонному прогрессированию нейродегенеративного процесса.

С тех пор, как была доказана ключевая роль α -синуклеина в развитии БП, ведутся активные работы по созданию клеточных и животных моделей, отражающих различные аспекты нарушения метаболизма этого белка, в которых проявляется его патологическая агрегация и токсическое действие на клетки. С помощью таких моделей за последние годы были значительно расширены представления о патогенезе БП [41–46]. Вместе с тем остаются не до конца понятны конкретные молекулярные механизмы токсичности α -синуклеина, а также потенциальная эффективность антиагрегационной терапии для лечения БП. Клеточные модели на основе культур нейронального происхождения, экспрессирующие склонные к агрегации формы белка α -синуклеина человека, представляются наиболее удобными тест-системами для направленного поиска химических соединений, обладающих способностью ингибировать агрегацию α -синуклеина.

Методика

Получение генетических конструкторов в составе плазмидного вектора. Получение генетического конструктора, кодирующего белок α -синуклеин дикого типа (α -Syn WT), проводилось на основе тотальной комплементарной цепи ДНК (кДНК) человека методом ПЦР. Конструктор, кодирующий мутантную

форму белка A53T (α -Syn A53T), получали методом сайт-направленного мутагенеза [47, 48]. Исходные генетические конструкторы были любезно предоставлены проф. В.П. Бухманом. Полученные конструкторы клонировали в плазмидном векторе pcDNA3.1. Проводили рестрикцию вставки (α -Syn WT и α -Syn A53T) и вектора по сайтам встраивания ферментами Sfr274I (SibEnzyme, Россия) и HindIII (SibEnzyme, Россия). Продукт рестрикции наносили на гель-электрофорез и производили выделение из агарозного геля с использованием набора Cleanup S-Cap (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Далее производили лигирование с использованием набора T4 ДНК лигазы (Евроген, Россия). Далее проводилась химическая трансформация компетентных клеток XL1-Blue (Евроген, Россия). Отбирали бактериальные колонии, выделяли плазмидную ДНК с использованием набора Plasmid Miniprep Color (Евроген, Россия) и анализировали на наличие вставки методом рестрикции. Последовательность вставки в отобранных плаزمидях подтверждалась методом секвенирования по Сэнгеру.

Клеточные культуры. Полученные плазмидные конструкторы, кодирующие α -синуклеин, использовались для трансфекции клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y. Клетки SH-SY5Y выращивались на круглых покровных стеклах, предварительно покрытых поли-L-лизин (ПанЭко, Россия), в количестве 20×10^3 на стекло, в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США). Через 24 ч после посева проводилась трансфекция культур с использованием реагента Lipofectamine™ 2000 (ThermoScientific, США). Готовились комплексы липофектамина и плазмидной ДНК (в соотношении 1 мкл на 500 нг соответственно) в среде без сыворотки, после 20-минутной инкубации комплекс добавляли к клеткам, через 3 ч среду меняли на свежую. Тестируемое соединение артемизинин добавляли в среду в концентрации 1 мкМ при смене среды после трансфекции. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид (ДМСО).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для экспериментов по анализу агрегации α -синуклеина в клетках *in vitro* через 20 ч после трансфекции к клеткам добавлялся ингибитор протеасом MG132 в концентрации 10 мкМ на 4 ч. В качестве растворителя использовали ДМСО. После чего проводили иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к α -синуклеину (AB1903, Abcam, Великобритания) и маркеру апоптоза – активированной форме каспазы 3, CC3 (AB3623, Sigma-Aldrich, США). Клетки отмывали от среды с помощью фосфатно-солевого бу-

фера (ФСБ), фиксировали 4% параформальдегидом (ПФА) в течение 15 мин и проводили 5-минутную пермеабиллизацию холодным метанолом. Блокирование неспецифического связывания проводили в ФСБ-Твин20 с 5% козьей сывороткой в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее покровные стекла инкубировали с первичными антителами в разведении 1:1000 в блокирующем растворе в течение 1 ч при комнатной температуре. Промывали ФСБ и проводили инкубацию со вторичными флуоресцентно-меченными антителами Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™ 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific, США) и Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor™ 488 (A-11029, Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:1000 в растворе ФСБ-Твин20 в течение 90 мин при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток окрашивали с помощью 0,5 мкМ раствора DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в течение 3 мин при комнатной температуре. Покровные стекла монтировали на стеклянные предметные стекла в каплю среды Immu-Mount (ThermoScientific, США).

Получение и анализ изображений. Микросъемка окрашенных стекол проводилась с помощью прибора Cyation 3 (BioTek, США) с использованием программного обеспечения Gen5 3.08 (BioTek, США). На стекле сканировалась область размером не менее 2000×2000 мкм в флуоресцентном режиме. Область сшивали в единое панорамное изображение и анализировали количество клеток, окрашенных на специфический маркер. Для оценки общего числа клеток проводили окрашивание с помощью DAPI и последующий автоматический анализ. Среднее количество клеток в анализируемой области составило 5 000 на 4 мм^2 и не различалось между разными экспериментами. Конфокальные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания получены на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM880 (Carl Zeiss, ФРГ). Все изображения были получены при постоянных настройках усиления и пинхола с разрешением 1024×1024 пикселей. Изображения агрегатов получали с помощью объектива 40X, 100X и 63X (при конфокальной микроскопии). Количественная оценка средней интенсивности окрашивания α -синуклеина проводилась путем измерения интенсивности окрашивания антителами к α -синуклеину в пределах поля зрения, для каждой группы было проанализировано по 10 полей зрения. Также оценивалось количество клеток с агрегатами α -синуклеина путем прямого подсчета.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США) и GraphPad

Prism 8. Во всех случаях результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего ($\bar{X} \pm m$). Детали статистического анализа для каждой группы данных приведены в описании к рисункам. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В клетках нейробластомы человека SH-SY5Y моделировали экспрессию белка α -синуклеина дикого типа (α -Syn WT), а также его мутантной формы (α -Syn A53T) методом транзientной трансфекции с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine® 2000. Генетические конструкторы были получены на основе кДНК человека в плазмидном векторе pcDNA3.1. Для детекции рекомбинантного α -синуклеина в клетках использовали иммуноцитохимическую окраску антителами против α -синуклеина человека. В большинстве (около 80%) трансфицированных клеток наблюдалось равномерное распределение белка в цитоплазме без образования заметных скоплений (рис. 1, а/а, левая панель). Тогда как в оставшейся части клеток отмечалось выраженное накопление белка (более яркое окрашивание) и в тех из них, где его концентрация была наиболее высокой, обнаруживались плотные яркоокрашенные структуры с характерной для агрегатов морфологией (см. ниже).

Характер распределения белка и его агрегации не отличался для конструкторов α -Syn WT и α -Syn A53T. Таким образом, вне зависимости от формы белка (дикого типа или мутантный) обязательным условием для развития агрегации является высокий уровень его накопления в клетке. Одним из универсальных патологических факторов, способствующих накоплению склонных к агрегации белков в клетках нервной системы и приводящим к развитию протеинопатии, является нарушение утилизации неправильно свернутых белков [49, 50]. Для того чтобы смоделировать такое состояние, нами была использована обработка клеток ингибитором протеасом MG132. MG132 – широко распространенный пептидный альдегид, который легко проникает в клетки и избирательно ингибирует УПС деградации белков [51]. Известно, что ингибиторы протеасом способствуют накоплению патогенных модифицированных форм α -синуклеина и его агрегации [38, 51, 52]. На основании результатов ранее проведенных нами экспериментов по оценке токсичности MG132 для клеток SH-SY5Y (данные не представлены) была использована концентрация MG132 10 мкМ, которая вызывает умеренный стресс в культуре и снижает жизнеспособность клеток на 30% через 24 ч по-

сле начала инкубации. MG132 добавляли в питательную среду с клетками через 20 ч после трансфекции. К этому моменту в клетках нарабатывалось значительное количество рекомбинантного белка. При микроскопическом анализе уже через 4 ч после добавления MG132 наблюдалась выраженная агрегация α -синуклеина (рис. 1, а/а, правая панель), а через 24 ч отмечалась гибель большого числа трансфицированных клеток. Так как за данный временной интервал обработка клеток SH-SY5Y 10 мкМ MG132 не оказывает значительного эффекта на выживаемость клеток, можно заключить, что гибель объясняется токсическим действием агрегированных форм α -синуклеина. Для того, чтобы оценить агрегацию α -синуклеина в фазе активного роста и накопление агрегатов, дальнейший микроскопический анализ проводили на временной точке 4 ч после добавления MG132. При ингибировании УПС наблюдалась тенденция к увеличению числа клеток с агрегатами в культурах, экспрессирующих α -Syn WT, которая, однако, не достигала статистической значимости, тогда как при экспрессии α -Syn A53T количество таких клеток было значимо выше (рис. 1, б/б). Это свидетельствует о большей склонности α -Syn A53T к агрегации, которая проявляется в условиях нарушенной деградации белка. В этих же культурах был проведен анализ апоптотической гибели клеток с помощью окрашивания антителами к маркеру активированной каспазе 3 (CC3). В обычных условиях (без обработки MG132) количество CC3-позитивных клеток в культурах, экспрессирующих мутантную форму α -Syn A53T, было сравнимо с группой α -Syn WT, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к увеличению таких клеток для α -Syn A53T (рис. 1, в/в). Обработка MG132 достоверно повышала уровень апоптоза, но в равной степени для обеих форм белка (α -Syn WT и α -Syn A53T), что может быть объяснено коротким временем (4 ч) инкубации с MG132 (рис. 1, в/в). Примечательно, что во многих гибнущих клетках (CC3-позитивных) не наблюдалось агрегации α -синуклеина или его значительного накопления. Можно предположить, что гибель клеток в данном случае обусловлена действием экзогенных токсичных форм α -синуклеина, источником которых являются соседние клетки, в том числе после их гибели и выделения содержимого в среду. Этот феномен требует дальнейшего изучения.

Более подробный анализ на большом увеличении (1000X), а также с использованием конфокальной микроскопии (630X), выявил наличие нескольких морфологических типов скоплений и агрегатов белка α -синуклеина в клетках SH-SY5Y: 1) гомогенное распределение белка по всей цитоплазме клетки без ви-

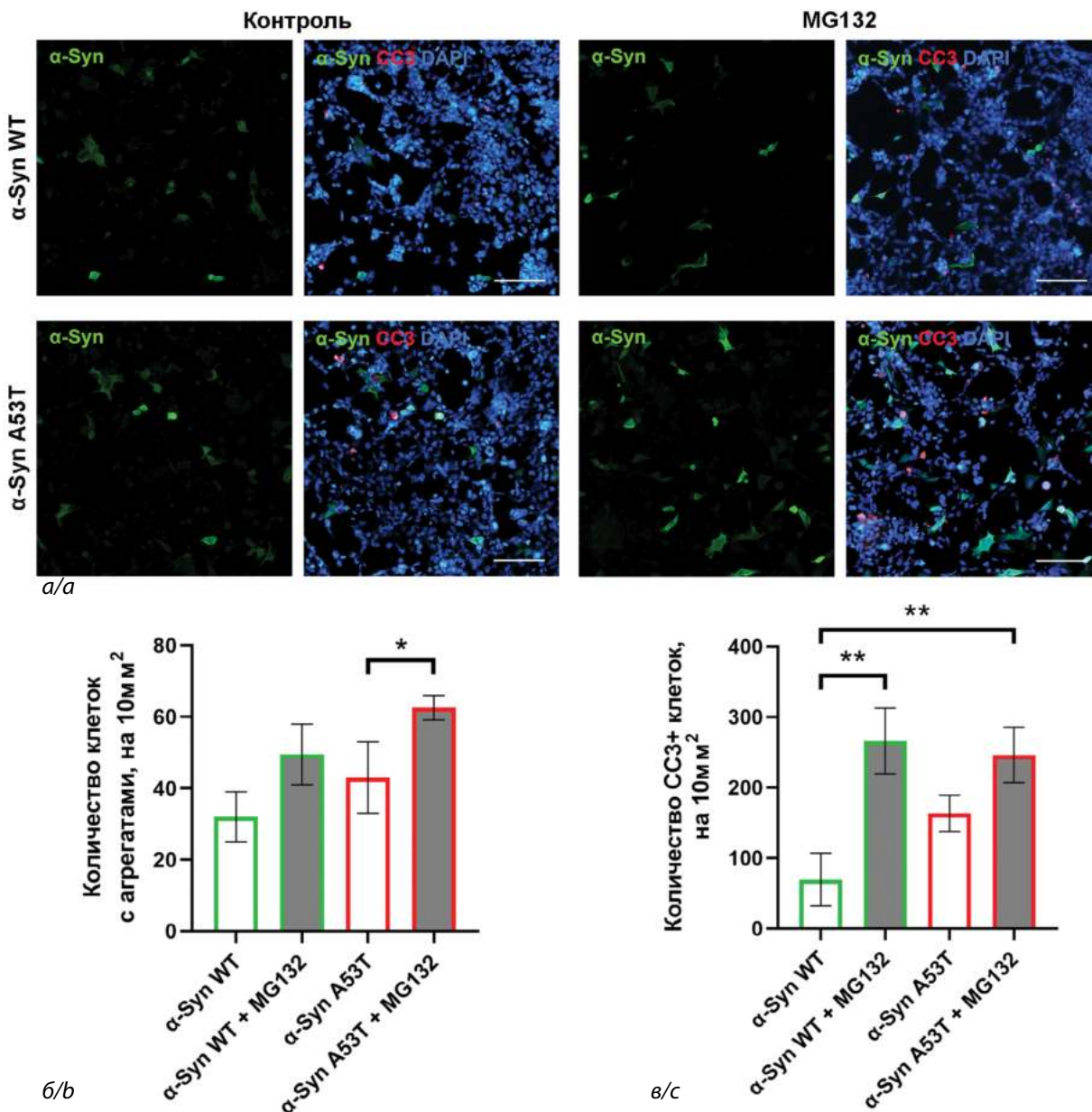


Рис. 1. Анализ агрегации рекомбинантного α-синуклеина дикого типа (α-Syn WT) и его мутантной формы (α-Syn A53T) в клетках SH-SY5Y при ингибировании убиквитин-протеасомной системы (обработка 10 мкМ MG132 в течение 4 ч) и в контрольных культурах (растворитель ДМСО).

а/а – репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания культур клеток с помощью антител к α-синуклеину (зеленый) и активированной каспазе 3 (CC3, красный), ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм; *б/б* – количество клеток с агрегатами в анализируемых культурах; *в/с* – количество клеток, экспрессирующих маркер апоптоза – активированную каспазу 3 (CC3+ клетки), в анализируемых культурах. Однофакторный дисперсионный анализ, тест Фишера для множественных сравнений, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

Fig. 1. Analysis of recombinant wild-type α-synuclein (α-Syn WT) and its mutant form (α-Syn A53T) aggregation in SH-SY5Y cells following inhibition of the ubiquitin-proteasome system (treatment with 10 μM MG132 for 4 hours) and in control cultures (DMSO solvent).

а/а – representative immunocytochemical images of cultured cells stained with antibodies against α-synuclein (green) and cleaved caspase-3 (CC3, red), while nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 100 μm. *б/б* – quantification of cells containing protein aggregates in the analyzed cultures. *в/с* – quantification of apoptotic cells expressing the cleaved caspase-3 (CC3+) marker in the analyzed cultures. One-way ANOVA with Fisher's multiple comparison test, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

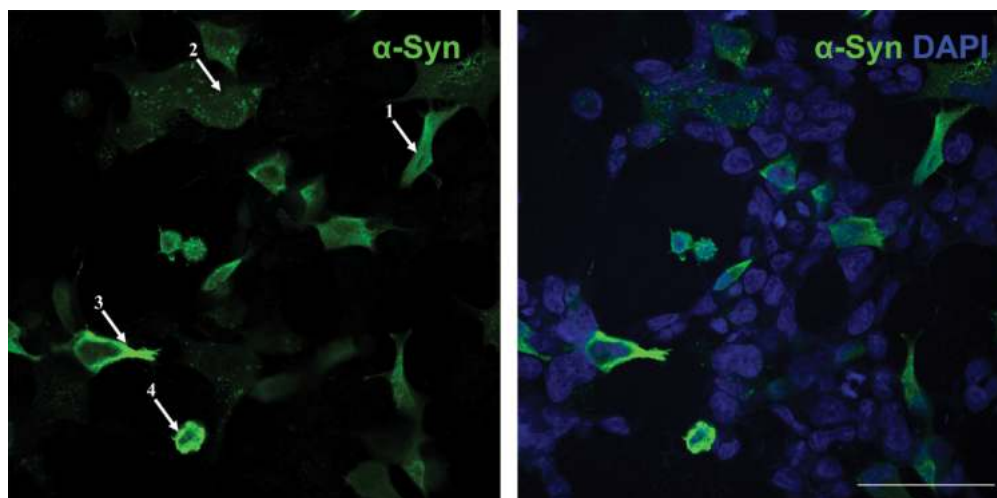


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания с помощью антител к α -синуклеину (зеленый) культур клеток SH-SY5Y, экспрессирующих α -Syn A53T при ингибировании убиквитин-протеасомной системы (обработка 10 μ M MG132 в течение 4 ч). Стрелками и цифрами указаны морфологические типы скопления белка α -синуклеина: 1 – гомогенное распределение, 2 – зернистые агрегаты, 3 – фибриллярные агрегаты, 4 – агресомы. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 50 μ m.

Fig. 2. Representative immunocytochemical images of SH-SY5Y cell cultures expressing α -Syn A53T stained with antibodies against α -synuclein (green) following inhibition of the ubiquitin-proteasome system (treatment with 10 μ M MG132 for 4 hours).

Arrows and numbers indicate different morphological types of α -synuclein accumulation: 1 – homogeneous distribution, 2 – granular aggregates, 3 – fibrillar aggregates, 4 – aggresomes. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μ m.

димых фокусов скопления; 2) зернистые – множество мелких агрегатов рассеянных в цитоплазме; 3) фибриллярные – цепочечные и кольцевые околоядерные тяжи; 4) агресомы – крупные цитоплазматические включения округлой формы с ореолом, часто располагающиеся около ядра, которое из-за этого имеет вдавленную форму (рис. 2). Данные варианты образования агрегатов α -синуклеином были описаны ранее [53–55]. Таким образом, полученная клеточная модель агрегации α -синуклеина отражает основные патологические события, характерные для альфа-синуклеинопатии: постепенное накопление белка, ассоциированное с формированием агрегатов различной морфологии, которая отражает степень развития агрегации, а также активацию апоптотической гибели клеток в культуре.

Для валидации полученной клеточной модели в качестве инструмента для поиска новых химических соединений с потенциальной антиагрегационной активностью нами было проведено тестирование вещества с известными антиагрегационными и нейропротекторными свойствами – артемизинина. Антиагрегационные свойства артемизинина и его производных были ранее продемонстрированы на животных моделях болезни Альцгеймера, в нервной системе которых наблюдается агрегация β -амилои-

да и тау-белка [56–58]. Недавно нами было показано, что артемизинин способен также блокировать агрегацию белка TDP-43 в культуре клеток SH-SY5Y в концентрации 1 μ M [59]. Для оценки влияния артемизинина на агрегацию α -синуклеина были получены клетки, экспрессирующие мутантный белок α -Syn A53T. Сразу после трансфекции к клеткам добавляли артемизинин (1 μ M), а через 20 ч стимулировали агрегацию добавлением MG132, анализ проводили через 4 ч после этого. Артемизинин снижал общее количество клеток с агрегатами на 50% в сравнении с контрольной культурой, к которой добавляли только MG132 (рис. 3, а/а, б/б).

Примечательно, что артемизинин не оказывал влияния на количество клеток, содержащих агресомы (рис. 3, в/в), но при этом значительно снижал количество клеток с гомогенным распределением белка и фибриллярными агрегатами. В то же время клеток с зернистыми мелкими агрегатами становилось больше под действием артемизинина. Можно заключить, что артемизинин специфически влияет на конкретные этапы агрегации, сдвигая процесс в направлении образования и стабилизации мелких гранулярных агрегатов. Анализ влияния тестируемых соединений на конкретные типы агрегатов при условии их хорошей морфологической дифференциации может быть удобным

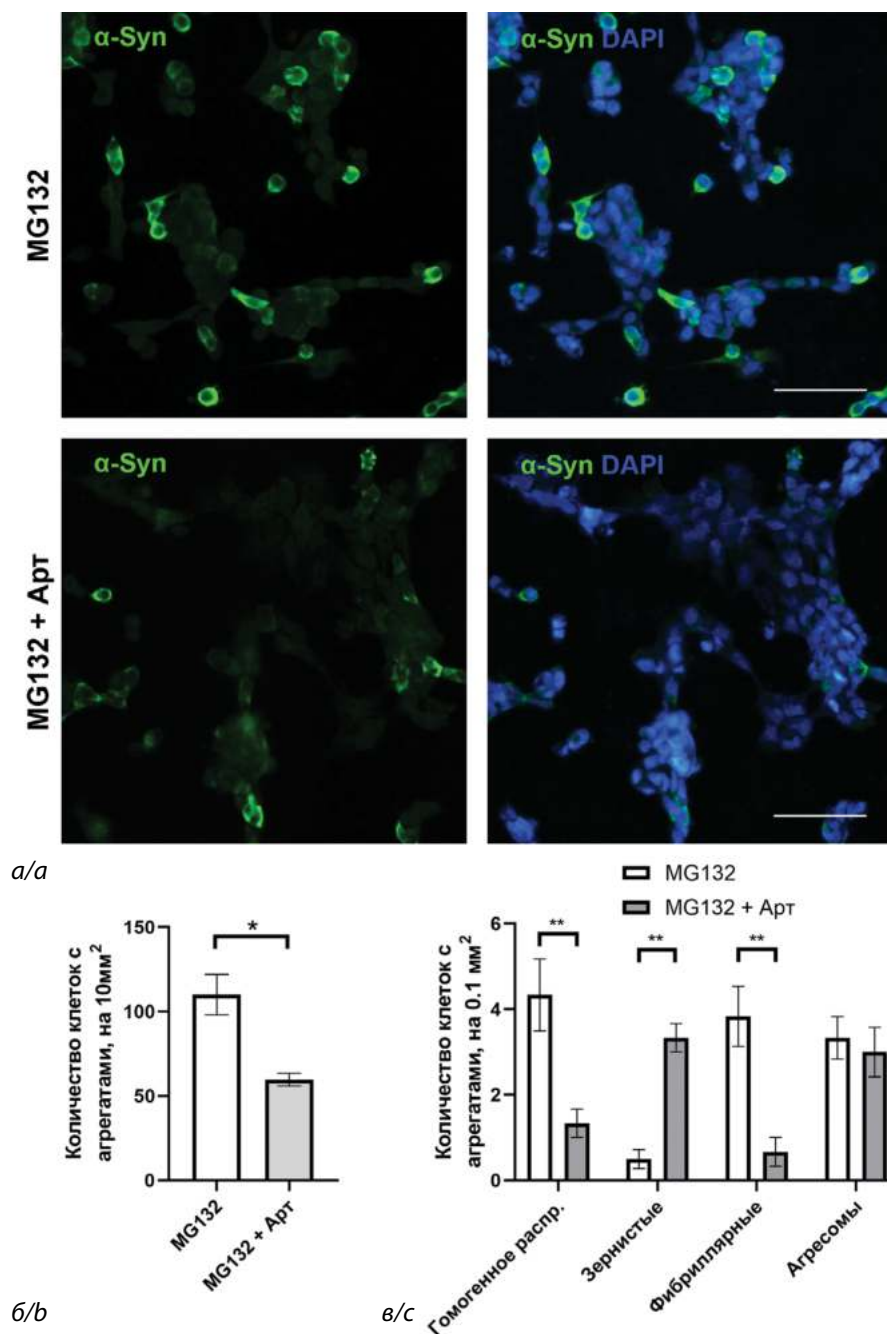


Рис. 3. Влияние артемизинина на агрегацию α -Syn A53T в клетках SH-SY5Y, при ингибировании убиквитин-протеасомной системы (обработка 10 мкМ MG132 в течение 4 ч).

a/a – репрезентативные микрофотографии клеток после обработки 1 мкМ артемизинина в течение 24 ч и 10 мкМ MG132 в течение последних 4 ч (MG132 + Арт) или только MG132 (MG132). Окрашивание проводилось с помощью антител к α -синуклеину (зеленый), ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм; *б/б* – количество клеток с агрегатами в анализируемых культурах. Тест Манна–Уитни, * – $p < 0.05$; *в/с* – количество клеток с разным типом скопления белка α -синуклеина после обработки 1 мкМ артемизинина в течение 24 ч и 10 мкМ MG132 в течение последних 4 ч (MG132 + Арт) или только MG132 (MG132). Двухфакторный дисперсионный анализ, тест Фишера для множественных сравнений, ** – $p < 0.01$.

Fig. 3. Effect of artemisinin on α -Syn A53T aggregation in SH-SY5Y cells following ubiquitin-proteasome system inhibition (treatment with 10 μ M MG132 for 4 hours).

a/a – representative micrographs of cells treated with 1 μ M artemisinin for 24 hours followed by 10 μ M MG132 for the last 4 hours (MG132 + Art) or only MG132 (MG132). Immunostaining was performed using antibodies against α -synuclein (green), and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 100 μ m; *б/б* – quantification of cells with protein aggregates in the analyzed cultures. Mann–Whitney test, * – $p < 0.05$; *в/с* – distribution of cells with different types of α -synuclein accumulation following treatment with 1 μ M artemisinin for 24 hours and 10 μ M MG132 for the last 4 hours (MG132 + Art) or only MG132 (MG132). Two-way ANOVA, Fisher’s multiple comparison test, ** – $p < 0.01$.

инструментом для уточнения механизмов действия и ожидаемых эффектов при поиске потенциальных нейропротекторных препаратов.

Обсуждение

Нами была получена модель агрегации белка α -синуклеина на основе клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y человека, в которой воспроизводятся основ-

ные молекулярные патологические события, характерные для синуклеинопатии. В клетках наблюдается формирование характерных белковых отложений, образуемых α -синуклеином и оказывающих токсическое действие, что приводит к активации апоптотической гибели. Модель основана на транзientной экспрессии мутантной версии α -синуклеина A53T человека с дополнительной кратковременной обработкой

низкотоксичной концентрацией ингибитора протеасом MG132.

Известно, что увеличение числа копий гена *SCN1A* у человека, а значит уровня его экспрессии, само по себе может быть достаточным для развития паркинсонизма [60, 61]. Однако, в клеточных моделях со сверхэкспрессией α -синуклеина наблюдается, как правило, небольшое число клеток с агрегатами, а также отсутствие крупных агрегатов (телец Леви), которые обнаруживаются в аутопсийном материале пациентов с БП [42]. По-видимому, для развития полной картины заболевания необходимы дополнительные факторы, влияющие на способность клеток противостоять агрегации [62]. Для усиления агрегации α -синуклеина в клеточных культурах обычно используются различные токсины. Например, частота внутрицитоплазматических включений увеличивается при воздействии 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP+), ротенона или ингибиторов протеасом [63-65]. Совместная экспрессия синфилина-1 – белка, взаимодействующего с α -синуклеином, может вызывать образование включений в клетках H4 [66], а также в клетках HEK293 [53]. Наконец, белок p25a, специфичный для мозга, также был идентифицирован как стимулятор агрегации α -синуклеина *in vitro* [67]. Нарушение работы УПС для усиления патологии, связанной с агрегацией α -синуклеина, представляется одной из самых оптимальных стратегий. С одной стороны, это обеспечивает непосредственное влияние на распад в клетке патологических форм белка, а с другой стороны, одним из механизмов токсического действия самого α -синуклеина является ингибирование УПС [35, 38, 68]. Таким образом, такой подход более полно моделирует патологические события в нервных клетках при БП.

Точные молекулярные механизмы, посредством которых α -синуклеин накапливается и способствует нейродегенерации при заболевании, остаются неизвестными. Идентификация и изучение различных продуктов агрегации α -синуклеина позволила предположить, что олигомеры и протофибриллы α -синуклеина обладают наибольшей нейротоксичностью [69]. Так, например, кольцеподобные олигомеры α -синуклеина взаимодействуют с цитоплазматической мембраной и образуют трансмембранные поры, вызывая аномальный внутриклеточный приток кальция [70]. Тогда как зрелые агрегаты могут рассматриваться в качестве менее токсичных конечных продуктов агрегации. Считается, что разные типы отложений представляют собой последовательные этапы накопления и агрегации α -синуклеина в клетке [71-73]. По мере увеличения локальной концентрации белка он переходит от го-

могенного равномерного распределения в цитоплазме к формированию мелких скоплений (фокусов), которые далее сливаются и образуют все более крупные агрегаты фибриллярной или более-менее округлой формы. На последних стадиях агрегации клетка может быть почти полностью заполнена одним или несколькими крупными перенуклеарными агрегатами (агресомами). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что образование агресома не обязательно коррелирует с апоптотической гибелью клеток. Среди апоптотических клеток значительно больше агресомаотрицательных по сравнению с агресомаположительными [53]. Это свидетельствует в пользу того, что конечные продукты агрегации скорее выполняют защитную функцию, удерживая в себе токсичные формы белка. Понимание природы различных структур α -синуклеина, способов их формирования и их относительного вклада в α -синуклеин-опосредованную токсичность может послужить основой для разработки, профилактики и терапии заболеваний. Поэтому при скрининге новых потенциальных препаратов с антиагрегационной активностью необходимо использовать модели, в которых формируются различные типы агрегатов и определять, на какие из них влияет тестируемое соединение.

При поиске химических веществ с антиагрегационной активностью важным представляется оптимальный подбор тест-систем для обеспечения эффективного и надежного отбора соединений с заданными свойствами [74, 75]. Описанная в данной работе модель может быть использована в качестве тест-системы для отбора препаратов влияющих на агрегацию α -синуклеина. Отработаны подходы к анализу выраженности агрегации в клетках с помощью иммуноцитохимической окраски агрегатов и их морфологического анализа. Относительно небольшое время, необходимое для проведения тестирования, и легкость масштабирования при работе с иммортализованными клеточными линиями делает полученную модель удобным инструментом для высокопроизводительного скрининга больших библиотек соединений. С использованием данной модели нами показано, что артемизинин – соединение с известной антиагрегационной и нейропротекторной активностью, способен подавлять агрегацию α -синуклеина в первую очередь за счет уменьшения количества ранних продуктов агрегации и при этом не влияя на образование агресома. Интересно, что под действием артемизинина увеличивалось количество клеток, содержащих мелкие гранулярные агрегаты, которые могут служить предшественниками агресома. Таким образом, описываемая нами модельная

система позволяет также оценивать влияние тестируемых соединений на развитие протеинопатии, в частности изменение направления в сторону образования конечных или более ранних продуктов агрегации.

Литература/ References

- Uversky V.N. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2003; 21: 211-34. <https://doi.org/10.1080/07391102.2003.10506918>
- Burre J., Sharma M., Sudhof T.C. Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018; 8: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>
- Weinreb P.H., Zhen W., Poon A.W., Conway K.A., Lansbury P.T., Jr. NACP. A protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 1996; 35: 13709-15. <https://doi.org/10.1021/bi961799n>
- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273: 9443-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9443>
- Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J. Alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011; 477: 107-10. <https://doi.org/10.1038/nature10324>
- Pringsheim T., Jette N., Frolkis A., Steeves T.D. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2014; 29: 1583-90. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Fusco G., De Simone A., Gopinath T., Vostrikov V., Vendruscolo M., Dobson C.M., et al. Direct observation of the three regions in alpha-synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nature communications*. 2014; 5: 3827. <https://doi.org/10.1038/ncomms4827>
- Lautenschlager J., Stephens A.D., Fusco G., Strohl F., Curry N., Zacharopoulou M., et al. C-terminal calcium binding of alpha-synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nature communications*. 2018; 9: 712. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03111-4>
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience*. 2001; 2: 492-501. <https://doi.org/10.1038/35081564>
- Spillantini M.G., Schmidt, M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997; 388: 839-40. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Srinivasan E., Chandrasekhar G., Chandrasekar P., Anbarasu K., Vickram A.S., Karunakaran R., et al. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease. *Frontiers in medicine*. 2021; 8: 736978. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.736978>
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276: 2045-7. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Ly Z., Krasnoslobodtsev A.V., Zhang Y., Ysselstein D., Rochet J.C., Blanchard S.C., et al. Direct Detection of alpha-Synuclein Dimerization Dynamics: Single-Molecule Fluorescence Analysis. *Biophysical journal*. 2015; 108: 2038-47. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.010>
- Ohgita T., Namba N., Kono H., Shimanouchi T., Saito H. Mechanisms of enhanced aggregation and fibril formation of Parkinson's disease-related variants of alpha-synuclein. *Scientific reports*. 2022; 12: 6770. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10789-6>
- Lazaro D.F., Rodrigues E.F., Langohr R., Shahpasandzadeh H., Ribeiro T., Guerreiro P., et al. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS genetics*. 2014; 10: e1004741. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>
- Teravskis P.J., Covelo A., Miller E.C., Singh B., Martell-Martinez H.A., Benneyworth M.A., et al. A53T Mutant Alpha-Synuclein Induces Tau-Dependent Postsynaptic Impairment Independently of Neurodegenerative Changes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2018; 38: 9754-67. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0344-18.2018>
- Smith W.W., Jiang H., Pei Z., Tanaka Y., Morita H., Sawa A., et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Human molecular genetics*. 2005; 14: 3801-11. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi396>
- Mercado G., Castillo V., Vidal R., Hetz C. ER proteostasis disturbances in Parkinson's disease: novel insights. *Frontiers in aging neuroscience*. 2015; 7: 39. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00039>
- Colla E., Coune P., Liu Y., Pletnikova O., Troncoso J.C., Iwatsubo T., et al. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012; 32: 3306-20. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5367-11.2012>
- Chen X., Shi C., He M., Xiong S., Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*. 2023; 8: 352. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01570-w>
- Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2019; 20: 421-35. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- Busch D.J., Oliphint P.A., Walsh R.B., Banks S.M., Woods W.S., George J.M., et al. Acute increase of alpha-synuclein inhibits synaptic vesicle recycling evoked during intense stimulation. *Molecular biology of the cell*. 2014; 25: 3926-41. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0708>
- Roman-Vendrell C., Medeiros A.T., Sanderson J.B., Jiang H., Bartels T., Morgan J.R. Effects of Excess Brain-Derived Human alpha-Synuclein on Synaptic Vesicle Trafficking. *Frontiers in neuroscience*. 2021; 15: 639414. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639414>
- Lotharius J., Barg S., Wiekop P., Lundberg C., Raymon H.K., Brundin P. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 38884-38894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205518200>
- Oliveira da Silva M.I., Liz M.A. Linking Alpha-Synuclein to the Actin Cytoskeleton: Consequences to Neuronal Function. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020; 8: 787. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00787>
- Cartelli D., Aliverti A., Barbiroli A., Santambrogio C., Ragg E.M., Casagrande F.V., et al. Alpha-Synuclein is a Novel Microtubule Dynamase. *Scientific reports*. 2016; 6: 33289. <https://doi.org/10.1038/srep33289>
- Angelova P.R., Ludtmann M.H., Horrocks M.H., Negoda A., Cremades N., Klenerman D., et al. Ca²⁺ is a key factor in alpha-synuclein-induced neurotoxicity. *Journal of cell science*. 2016; 129: 1792-801. <https://doi.org/10.1242/jcs.180737>

28. Potdar C., Kaushal A., Raj A., Mallick R., Datta I. Reduction of phosphorylated alpha-synuclein through downregulation of casein kinase 2alpha alleviates dopaminergic-neuronal function. *Biochemical and biophysical research communications*. 2022; 615: 43-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.05.023>
29. Bir A., Sen O., Anand S., Khemka V.K., Banerjee P., Cappai R., et al. Alpha-Synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: implications in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2014; 131: 868-77. <https://doi.org/10.1111/jnc.12966>
30. Ganguly U., Chakrabarti S.S., Kaur U., Mukherjee A., Chakrabarti S. Alpha-synuclein, Proteotoxicity and Parkinson's Disease: Search for Neuroprotective Therapy. *Current neuropharmacology*. 2018; 16: 1086-97. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666171129100944>
31. Di Maio R., Barrett P.J., Hoffman E.K., Barrett C.W., Zharikov A., Borah A., et al. Alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*. 2016; 8: 342ra378. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>
32. Deas E., Cremades N., Angelova P.R., Ludtmann M.H., Yao Z., Chen S., et al. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2016; 24: 376-91. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6343>
33. Ebrahimi-Fakhari D., Cantuti-Castelvetri I., Fan Z., Rockenstein E., Masliah E., Hyman B.T., et al. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011; 31: 14508-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011>
34. Webb J.L., Ravikumar B., Atkins J., Skepper J.N., Rubinsztein D.C. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278: 25009-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
35. Nonaka T., Hasegawa M. A cellular model to monitor proteasome dysfunction by alpha-synuclein. *Biochemistry*. 2009; 48: 8014-22. <https://doi.org/10.1021/bi900619j>
36. Martinez-Vicente M., Talloczy Z., Kaushik S., Massey A.C., Mazzulli J., Mosharov E.V., et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 777-88. <https://doi.org/10.1172/JCI32806>
37. Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001; 21: 9549-60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09549.2001>
38. McKinnon C., De Snoo M.L., Gondard E., Neudorfer C., Chau H., Ngana S.G., et al. Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by alpha-synuclein. *Acta neuropathologica communications*. 2020; 8: 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0894-0>
39. Lim K.L., Tan J.M. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC biochemistry*. 2007; 8 Suppl 1: S13. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-S1-S13>
40. Rott R., Szargel R., Haskin J, Bandopadhyay R., Lees A.J., Shani V., et al. Alpha-Synuclein fate is determined by USP9X-regulated monoubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 18666-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105725108>
41. Lazaro D.F., Pavlou M.A.S., Outeiro T.F. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2017; 298: 162-71. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.007>
42. Delenclos M., Burgess J.D., Lamprokostopoulou A., Outeiro T.F., Vekrellis K., McLean P.J. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of neurochemistry*. 2019; 150: 566-76. <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>
43. Visanji N.P., Brotchie J.M., Kalia L.V., Koprich J.B., Tandon A., Watts J.C., et al. Alpha-Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends in neurosciences*. 2016; 39: 750-62. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.003>
44. Koprich J.B., Kalia L.V., Brotchie J.M. Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nature reviews. Neuroscience*. 2017; 18: 515-29. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.75>
45. Gomez-Benito M., Granado N., Garcia-Sanz P., Michel A., Dumoulin M., Moratalla R. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Frontiers in pharmacology*. 2020; 11: 356. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00356>
46. Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *Journal of Parkinson's disease*. 2017; 7: S51-S69. <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>
47. Kunkel T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 488-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.488>
48. Xia Y., Chu W., Qi Q., Xun L. New insights into the QuikChange process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic acids research*. 2015; 43: e12. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1189>
49. Smith D.M. Could a Common Mechanism of Protein Degradation Impairment Underlie Many Neurodegenerative Diseases? *Journal of experimental neuroscience*. 2018; 12: 1179069518794675. <https://doi.org/10.1177/1179069518794675>
50. Amirian R., Badrbani M.A., Derakhshankhah H., Izadi Z., Shahbazi M.A. Targeted protein degradation for the treatment of Parkinson's disease: Advances and future perspective. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2023; 166: 115408. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115408>
51. Bang Y., Kang B.Y., Choi H.J. Preconditioning stimulus of proteasome inhibitor enhances aggresome formation and autophagy in differentiated SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*. 2014; 566: 263-8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.056>
52. Kim Y.M., Jang W.H., Quezado M.M., Oh Y., Chung K.C., Junn E., et al. Proteasome inhibition induces alpha-synuclein SUMOylation and aggregate formation. *Journal of the neurological sciences*. 2011; 307: 157-61. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.04.015>
53. Tanaka M., Kim Y.M., Lee G., Junn E., Iwatsubo T., Mouradian M.M. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 4625-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310994200>
54. Opazo F., Krenz A., Heermann S., Schulz J.B., Falkenburger B.H. Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging. *Journal of neurochemistry*. 2008; 106: 529-40. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05407.x>

55. Dhakal S., Mondal M., Mirzazadeh A., Banerjee S., Ghosh A., Rangachari V. alpha-Synuclein emulsifies TDP-43 prion-like domain-RNA liquid droplets to promote heterotypic amyloid fibrils. *Communications biology*. 2023; 6: 1227. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05608-1>
56. Kiss E., Kins S., Zoller Y., Schilling S., Gorgas K., Gross D., et al. Artesunate restores the levels of inhibitory synapse proteins and reduces amyloid-beta and C-terminal fragments (CTFs) of the amyloid precursor protein in an AD-mouse model. *Molecular and cellular neurosciences*. 2021; 113: 103624. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103624>
57. Xiao M., Xiang W., Chen Y., Peng N., Du X., Lu S., et al. DHA Ameliorates Cognitive Ability, Reduces Amyloid Deposition, and Nerve Fiber Production in Alzheimer's Disease. *Frontiers in nutrition*. 2022; 9: 852433. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.852433>
58. Kisler K., Sagare A.P., Lazic D., Bazzi S., Lawson E., Hsu C.J., et al. Anti-malaria drug artesunate prevents development of amyloid-beta pathology in mice by upregulating PICALM at the blood-brain barrier. *Molecular neurodegeneration*. 2023; 18: 7. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00597-5>
59. Pukhov S.A., Semakov A.V., Pukaeva N.E., Kukharskaya O.A., Ivanova T.V., Kryshkova V.S., et al. Artemisinin Stimulates Neuronal Cell Viability and Possess a Neuroprotective Effect In Vitro. *Molecules*. 2025; 30: <https://doi.org/10.3390/molecules30010198>
60. Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 364: 1167-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
61. Devine M.J., Gwinn K., Singleton A., Hardy J. Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011; 26: 2160-8. <https://doi.org/10.1002/mds.23948>
62. Kim H.J., Jeon B.S., Yoon M.Y., Park S.S., Lee K.W. Increased expression of alpha-synuclein by SNCA duplication is associated with resistance to toxic stimuli. *Journal of molecular neuroscience: MN*. 2012; 47: 249-55. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9732-6>
63. Lee H.J., Shin S.Y., Choi C., Lee Y.H., Lee S.J. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 5411-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105326200>
64. Wan O.W., Chung K.K. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS one*. 2012; 7: e38545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038545>
65. Kalivendi S.V., Cunningham S., Kotamraju S., Joseph J., Hillard C.J., Kalyanaraman B. Alpha-synuclein up-regulation and aggregation during MPP+-induced apoptosis in neuroblastoma cells: intermediacy of transferrin receptor iron and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 15240-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312497200>
66. McLean P.J., Kawamata H., Hyman B.T. Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience*. 2001; 104: 901-12. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00113-0)
67. Lindersson E., Lundvig D., Petersen C., Madsen P., Nyengaard J.R., Hojrup P., et al. P25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280: 5703-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410409200>
68. Lindersson E., Beedholm R., Hojrup P., Moos T., Gai W., Hendil K.B., et al. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 12924-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306390200>
69. Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J., Lozano A.M., Lang A.E. Alpha-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of neurology*. 2013; 73: 155-69. <https://doi.org/10.1002/ana.23746>
70. Calabresi P., Mechelli A., Natale G., Volpicelli-Daley L., Di Lazzaro G., Ghiglieri V. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell death & disease*. 2023; 14: 176. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05672-9>
71. Ray S., Singh N., Kumar R., Patel K., Pandey S., Datta D., et al. Alpha-Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nature chemistry*. 2020; 12: 705-16. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0465-9>
72. Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E. alpha-synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *Journal of neurochemistry*. 2019; 150: 522-34. <https://doi.org/10.1111/jnc.14808>
73. de Oliveira G.A.P., Silva J.L. Alpha-synuclein stepwise aggregation reveals features of an early onset mutation in Parkinson's disease. *Communications biology*. 2019; 2: 374. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0598-9>
74. Home R.I., Andrzejewska E.A., Alam P., Brotzakis Z.F., Srivastava A., Aubert A., et al. Discovery of potent inhibitors of alpha-synuclein aggregation using structure-based iterative learning. *Nature chemical biology*. 2024; 20: 634-45. <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01580-x>
75. Gitto R., Vittorio S., Bucolo F., Pena-Diaz S., Siracusa R., Cuzzocrea S., et al. Discovery of Neuroprotective Agents Based on a 5-(4-Pyridinyl)-1,2,4-triazole Scaffold. *ACS chemical neuroscience*. 2022; 13: 581-6. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00849>

Сведения об авторах:

Пукаева Надежда Евгеньевна, мл. науч. сотр., лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; инженер, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Кухарская Ольга Александровна, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; доцент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Иванова Татьяна Витальевна, лаборант, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Наздрачева Майя Романовна, лаборант, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Бурак Марина Владимировна, лаборант, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Попов Александр Александрович, ассистент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Овчинников Руслан Константинович, канд. мед. наук, науч. сотр., лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; доцент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Антохин Александр Иванович, доктор биол. наук, проф., каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, доцент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; руководитель центра коллективного пользования научным оборудованием, ФГБНУ «НИИОПП»;

Кухарский Михаил Сергеевич, доктор биол. наук, зав. лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; зав. каф., каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2025

УДК 616-008.8/616-092.6

Галимова Э.Ф.¹, Громенко И.Д.¹, Галимов Ш.Н.¹, Гилязова И.Р.^{1,4}, Громенко Д.Д.¹, Галимов К.Ш.², Ткаченко С.В.³, Литвицкий П.Ф.²**Экзосомальные микроРНК в патогенезе идиопатического мужского бесплодия**¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1;⁴Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, 450054, Уфа, Россия, просп. Октября, д. 71

Введение. Исследования последних лет сосредоточены на поиске новых информативных методов диагностики мужского бесплодия, которые позволили бы полнее характеризовать функциональную эффективность сперматозоидов. Одним из таких методов, на который возлагаются большие надежды, стала оценка экспрессии малых некодирующих РНК – микроРНК. Для этих молекул характерна способность модулировать различные этапы сперматогенеза путем изменения регуляции генов. Благодаря этому их скрининговая оценка позволит не только расширить диагностические возможности в клинике, но и глубже исследовать механизмы идиопатического мужского бесплодия.

Цель исследования: изучить возможность использования экзосомальных микроРНК miR-20a, miR-135a, miR-34b, miR-449b, miR-449c в качестве маркеров мужского бесплодия и оценить зависимость эффективности программ ВРТ от уровня их экспрессии.

Методика. В основную группу вошли пациенты, вступающие в программу ВРТ (вспомогательные репродуктивные технологии) с установленным диагнозом идиопатического мужского бесплодия ($n=30$), в контрольную – супружеские пары с женским бесплодием трубного происхождения ($n=19$). Выделение и изоляция экзосомальной микроРНК, содержащейся во внеклеточных везикулах эякулята проводилось с помощью набора реагентов exoRNeasy Midi. Для оценки экспрессии экзосомальных микроРНК (miR-20a, miR-135a, miR-34b, miR-449b, miR-449c и контрольной miR-16) использовалась система miRCURY LNA miRNA SYBR® Green PCR System.

Результаты. Экспрессия экзосомальных miR-449c и miR-135a была значимо снижена в основной группе ($p=0,03156$ и $p=0,0477$, соответственно). Также отмечена тенденция к снижению экспрессии miR-20a, miR-34b и miR-449b. С большой достоверностью уровень экспрессии miR-34b, miR-449b, и miR-449c и miR-135a имел прямую зависимость с эффективностью программ ВРТ. Сила корреляционной связи вышеописанных отношений по шкале Чеддока была умеренной.

Заключение. Исследованные нами микроРНК могут быть использованы в качестве диагностического маркера мужской фертильности, а также для оценки эффективности процессов оплодотворения и формирования эмбриона.

Ключевые слова: идиопатическое мужское бесплодие; экспрессия экзосомальных микроРНК

Для цитирования: Галимова Э.Ф., Громенко И.Д., Галимов Ш.Н., Гилязова И.Р., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Ткаченко С.В., Литвицкий П.Ф. Экзосомальные микроРНК в патогенезе идиопатического мужского бесплодия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 42–48.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.42-48

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

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

Финансирование. Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00140

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.11.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Galimova E.F.¹, Gromenko I.D.¹, Galimov Sh.N.¹, Gilyazova I.R.^{1,4}, Gromenko D.D.¹, Galimov K.Sh.², Tkachenko S.V.³, Litvitskiy P.F.²

Exosomal microRNAs in the pathogenesis of idiopathic male infertility

¹Bashkir State Medical University, 3 Lenina St., Ufa, 450008, Russian Federation;

²Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya St., Bldg. 2, Moscow, 119991, Russian Federation;

³Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russian Federation;

⁴Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Federal Research Center, Republic of Bashkortostan, 71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation

Introduction. Recent studies have focused on finding new informative methods for diagnosing male infertility that would better characterize the functional efficiency of spermatozoa. One of such methods, which has high expectations, is assessing the expression of small non-coding RNAs, microRNAs. These molecules are able to modulate various stages of spermatogenesis by changing the gene regulation. Therefore, screening for some of them will not only expand clinical diagnostic capabilities but also allow a deeper insight into the mechanisms of idiopathic male infertility. **Aim of the study:** to evaluate the use of miR-20a, miR-135a, miR-34b, miR-449b, and miR-449c as markers of male infertility and to assess the dependence of the effectiveness of assisted reproductive technology (ART) programs on the expression level of exosomal microRNAs.

Methods. The main group included patients enrolled to the ART program with a confirmed diagnosis of idiopathic male infertility ($n=30$); the control group included married couples with female infertility of tubal origin ($n=19$). Exosomal microRNA was isolated from extracellular vesicles of the ejaculate using an exoRNeasy Midi reagent kit. The miRCURY LNA miRNA SYBR® Green PCR System was used to assess the expression of exosomal microRNAs (miR-20a, miR-135a, miR-34b, miR-449b, miR-449c and control miR-16).

Results. The expression of exosomal miR-449c and miR-135a was significantly reduced in the main groups ($p=0.03156$ and $p=0.0477$, respectively). A tendency toward decreased expression was also noted for miR-20a, miR-34b, and miR-449v. The expression level of miR-34b, miR-449v, and miR-449c and miR-135a was highly significantly correlated with the effectiveness of ART programs. The strength of the Chaddock correlation between the above-described relationships was moderate.

Conclusion. MicroRNAs selected for the study can be used as a diagnostic marker of male infertility, as well as for evaluating the efficiency of fertilization and embryo formation.

Keywords: idiopathic male infertility; expression of exosomal microRNAs

For citation: Galimova E.F., Gromenko I.D., Galimov Sh.N., Gilyazova I.R., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Tkachenko S.V., Litvitskiy P.F. Exosomal microRNAs in the pathogenesis in idiopathic male infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 42–48. (in Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.42-48

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

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

Information about the authors:

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

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

Galimov Sh.N., <https://orcid.org/0000-0002-5871-5151>

Gilyazova I.R., <https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>

Gromenko D.D., <https://orcid.org/0000-0001-5638-1779>

Galimov K.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0148-4380>

Tkachenko S.V., <https://orcid.org/0009-0009-5619-8312>

Litvitskiy P.F., <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Financing. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-25-00140.

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

Поступила 28.11.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Введение

Бесплодие является одной из основных проблем здравоохранения во всем мире и, согласно С. Сох и соавт., его распространенность достигает 17,5 % в зависи-

мости от исследуемой популяции [1]. Ситуация усугубляется с течением времени: в период с 1990 по 2017 гг. распространенность бесплодия в пересчете на средние показатели ежегодно увеличивалась на 0,370% у женщин и на 0,291% у мужчин [2]. По данным последнего

мета-анализа, выполненного группой Н. Levine и соавт., глобальные тенденции снижения общего количества сперматозоидов в эякуляте вызывают серьезные опасения: так, в период с 1973 по 2018 гг. оно снизилось на 62,3% с темпом $-4,70$ млн/год, при этом процент снижения концентрации сперматозоидов в год удвоился, увеличившись с 1,16% после 1972 г. до 2,64% после 2000 г. [3].

Экономическое и социальное бремя мужского бесплодия широко признано. Все более убедительные доказательства связывают снижение качества эякулята с ростом смертности и заболеваемости по всем причинам [4].

Причины мужского бесплодия разнообразны и еще недостаточно изучены: на долю идиопатических форм приходится до 40% всех его выявленных случаев [5, 6]. Хотя существуют различные специализированные диагностические тесты для уточнения причин infertility, их интерпретация неточна и часто субъективна. Современный стандарт диагностики бесплодия, основанный на анализе спермограммы, имеет ряд недостатков: (1) нормальные показатели спермограммы не гарантируют зачатия; (2) существует значительное совпадение между параметрами спермы фертильных и бесплодных мужчин; (3) анализ спермы не дает информации об оплодотворяющей способности сперматозоидов [7]. Таким образом, поиск новых биомаркеров бесплодия является одной из актуальных задач современной медицины.

В последнее время показано, что молекулы некодирующей РНК, известные как микроРНК (miRNAs), одноцепочечные структуры длиной 18-25 нуклеотидов, чья основная функция – регуляция экспрессии генов путем образования полукомплементарных структур в 3' нетранслируемой области их целевой матричной РНК, могут быть вовлечены в патогенез мужского бесплодия [8, 9]. Присутствие микроРНК в яичках, эпидидимисе, сперматозоидах, семенной плазме и внеклеточных везикулах, а также возможность этих молекул модулировать различные этапы сперматогенеза путем повышения или понижения регуляции активности генов, явилось основанием для представления о том, что микроРНК могут использоваться для создания новых методов диагностики бесплодия и скрининга пациентов в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Обнаружено, что измененные уровни их экспрессии у мужчин ассоциируются со снижением количества сперматозоидов (олигозооспермией), низкой подвижностью сперматозоидов (астенозоспермией) и аномальной морфологией сперматозоидов (тератозоспермией) [10, 11].

Цель исследования – изучить возможность использования экзосомальных микроРНК miR-20a, miR-135a, miR-34b, miR-449b, miR-449c в качестве маркеров мужского бесплодия и оценить зависимость эффективности программ ВРТ от уровня их экспрессии.

Методика

Отбор пациентов для участия в исследовании осуществлялся из семейных пар вступавших в программы с применением вспомогательных репродуктивных технологий, на базе Медицинского Центра «Семья», г. Уфа. В основную группу ($n=30$) были отнесены супружеские пары с установленным диагнозом «Идиопатическое мужское бесплодие», аномальными показателями спермограммы, отсутствием женского фактора и достаточным ответом на овариальную стимуляцию (более 8 полученных ооцитов после трансвагинальной пункции фолликулов). В группу сравнения ($n=19$) были включены пациенты с женским трубным фактором бесплодия, нормальными показателями эякулята и доказанной фертильностью у мужчины-партнера. Все участники исследования подписали информированное добровольное согласие.

После двухдневного воздержания пациенты обеих групп сдавали эякулят путем мастурбации. Часть материала была использована для проведения повторной расширенной оценки морфокинетических параметров эякулята, оставшийся материал, объемом не менее 1 мл, был транспортирован после предварительной заморозки до -90° в НИИ «Урологии и клинической онкологии» ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» для осуществления основного этапа исследований.

Эякулят после оттаивания центрифугировали при 1600 g в течение 10 мин, а затем при 16 000 g еще 10 мин для удаления клеток и клеточных фрагментов. При выделении и изоляции экзосомальной микроРНК, содержащейся во внеклеточных везикулах, был использован набор реагентов exoRNeasy Midi. В основе метода лежит способность специальных мембран связывать и изолировать экзосомы и другие внеклеточные везикулы из предварительно очищенных биологических жидкостей. Для лизиса экзосом и элюирования содержащихся в них микроРНК использовался QIAzol Lysis Reagent, обеспечивающий практически полное удаление белков и остаточной ДНК. После добавления к лизату хлороформа и разделению полученного раствора на две фазы, верхняя водная фаза, содержащая суммарную РНК, забиралась. Затем полученный материал смешивался с 96% этанолом в соотношения 1:2 (фаза:спирт) и заливался в колонки

RNeasy MinElute spin column, где микроРНК связывалась с мембраной. Далее микроРНК высокой концентрации и качества элюировалась в микропробирку путем добавления 14 мкл очищенной от РНК воды.

Для оценки экспрессии микроРНК использовалась система miRCURY LNA miRNA SYBR® Green PCR System, характеризующаяся высокой специфичностью и способностью образовывать прочные термостабильные комплементарные связи между цепочками РНК. В основе метода лежит обратная транскрипция с последующей амплификацией с помощью ПЦР в режиме реального времени. Обратная транскрипция производилась на амплификаторе BIO-RAD Real-time CFX96 Touch. Для реакции были использованы буфер 5x miRCURY RT SYBR® Green Reaction Buffer, обратная транскриптаза 10x miRCURY RT Enzyme Mix (содержащая в своем составе Поли(А)полимеразу), очищенная от РНК вода и микроРНК, выделенная в ходе предыдущего этапа исследования. Обратная транскрипция осуществлялась при температуре 42°C в течение 1 часа с последующей инактивацией фермента. Вышеописанный процесс позволял получить одноцепочечную кДНК-матрицу для всех допустимых набором видов ПЦР-анализа.

Полученная кДНК амплифицировалась в режиме реального времени на аппарате Rotor-Gene Q 6plex с использованием ДНК-полимеразы (QuantiNova DNA-Polymerase) и флюоресцентного красителя SYBR® Green I. Амплификация в режиме реального времени осуществлялась в течение 50 циклов при температуре 60–95°C. Одновременно с этим осуществлялась детекция флюоресценции при длине волны 494 нм для итогового определения экспрессии микроРНК. Всего определялась экспрессия 6 микроРНК: miR-20a, miR-135a, miR-34b, miR-449b, miR-449c и контрольной miR-16.

Для интерпретации полученных результатов был применён биоинформатический анализ $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для оценки влияния экспрессии микроРНК на эффективность программ ВРТ была использована ранговая корреляция Спирмена с применением шкалы Чеддока для характеристики силы корреляционных связей. Визуализация результатов осуществлялась с помощью возможностей пакета Statistica 10 (Tibco, США) и Microsoft Excel 2019.

Результаты

Результаты исследования показали, что экспрессия экзосомальных miR-449c и miR-135a была значительно ниже в основной группе ($p=0,03156$ и $p=0,0477$, соответственно) (рис. 1). Также была отмечена тенден-

ция к снижению экспрессии для miR-20a, miR-34b и miR-449b ($p=0,08186$, $p=0,15272$ и $p=0,18684$, соответственно).

При сравнении результатов эмбриологического этапа программ ВРТ обнаружено, что с большой достоверностью уровень экспрессии miR-34b, miR-449b и miR-449c имеет прямую зависимость с частотой получения эмбрионов пятого дня хорошего качества ($p<0,01$). Сила корреляционной связи этих отношений по шкале Чеддока соответствует умеренной, с наибольшей величиной для miR-449c ($r=0,4876$). Для экспрессии miR-135a также была характерна корреляция с частотой получения бластоцист высокого качества, но с более низкой степенью достоверности ($p<0,05$). Сила корреляционной связи этого взаимоотношения была умеренная ($r=0,3333$) и наименьшая из полученных достоверных величин (рис. 2). Для miR-20a не было выявлено наличия связи с результативностью программ ВРТ ($p>0,05$)

Обсуждение

Выбор оцениваемых в нашем исследовании микроРНК был определен существующими в настоящее время данными фундаментальных работ, посвящённых оценке роли малых форм РНК в качестве биомаркеров мужского бесплодия. Внимание исследователей уже несколько лет привлекает семейство miR-34, которое состоит из шести членов (miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-449a, miR-449b, miR-449c), расположенных на трех различных хромосомах 1p36.22, 11q23.1 и 5q11.2 [12–18].

Объединив результаты этих и других исследований, К. Pantos и соавт. назвали основные механизмы, лежащие в основе указанной связи [19]. Согласно их мнению, подавление экспрессии микроРНК 34/449 может приводить к нарушению цитогенеза в эфферентных протоках яичка, что, в свою очередь, сопровождается снижением реабсорбции семенной жидкости, агрегацией и агглютинацией сперматозоидов с последующей обструкцией эфферентных канальцев и повышением гидростатического давления в яичках. Результатом этих процессов является снижение качества эякулята вплоть до азооспермии.

Другой постулируемый механизм – участие представителей семейства микроРНК 34/449 в регуляции сперматогенеза. При блоке экспрессии этих микроРНК нарушается клеточный цикл сперматогенеза, дифференцировка клеток, замедляется или полностью прекращается формирование жгутика сперматозоида, а также растёт скорость апоптоза клеток. Результаты нашего исследования показали, что экспрессия

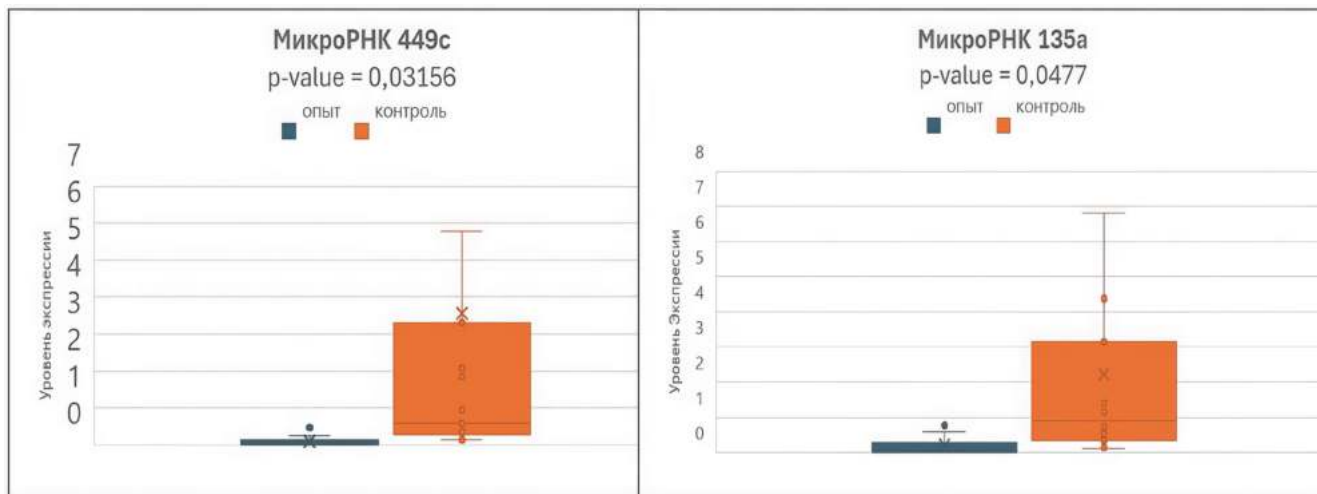


Рис. 1. Уровень экспрессии экзосомальных микроРНК в исследуемых группах.
Fig. 1. The level of expression of exosomal microRNAs in the study groups.

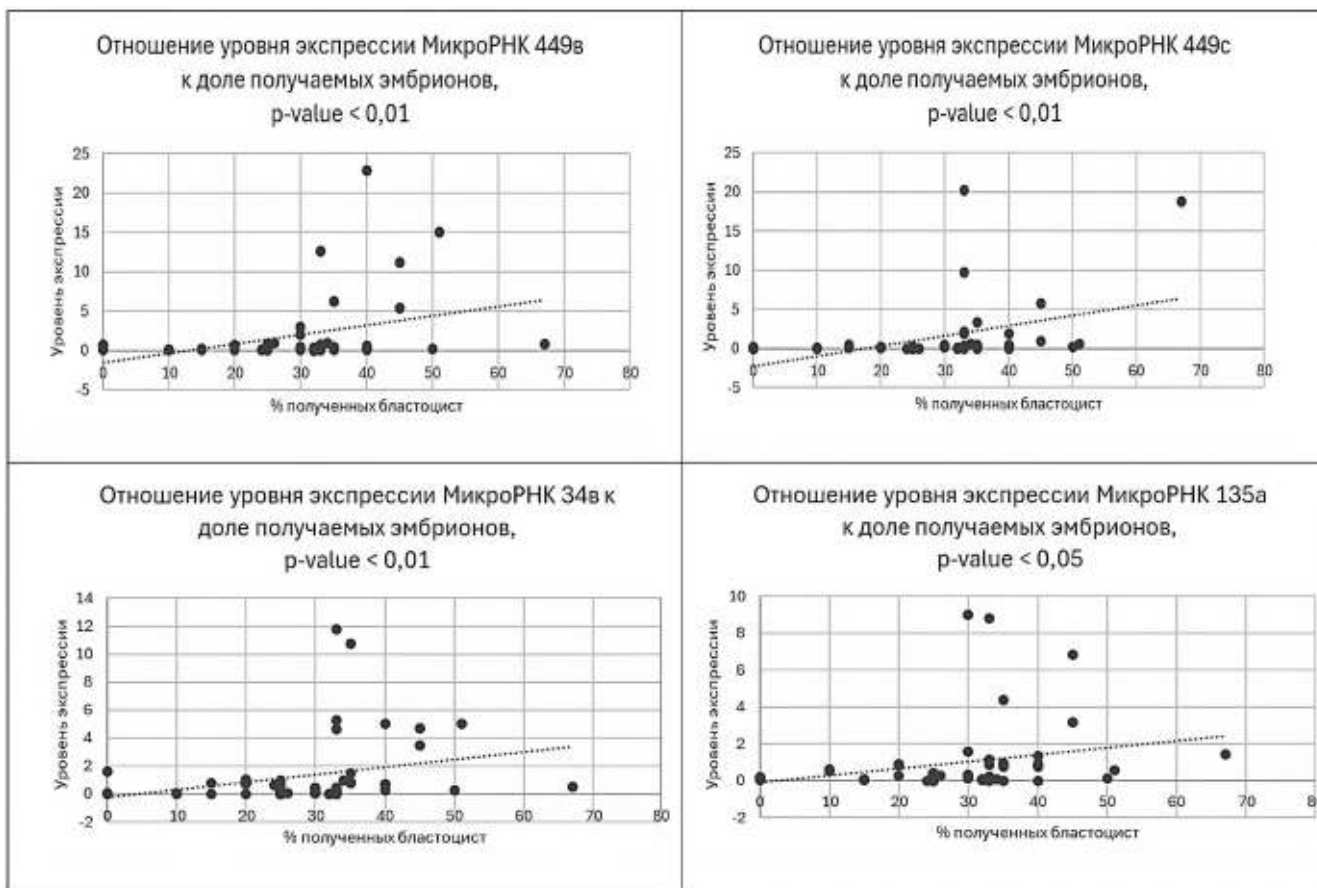


Рис. 2. Корреляционные взаимоотношения экспрессии отдельных микроРНК с результатами эмбриологического этапа программ ВРТ.
Fig. 2. Correlation of individual microRNAs' expression with the results of the embryological stage of ART programs.

miR-449c значительно снижается в группе пациентов с установленным мужским фактором бесплодия.

Наряду с этим, miR-34b, miR-449b, и miR-449c из семейства микроРНК 34/449 демонстрируют значимое влияние на эффективность зачатия и развития эмбрионов в программах ВРТ. Экспериментальные данные многих исследователей показали сходные закономерности. M. Eikmans и соавт. сообщили о снижении экспрессии miRNA-34b у пациентов с олигозооспермией и астенозооспермией ($p < 0,001$ и $p < 0,05$, соответственно) [14]. Похожую корреляцию отмечают и другие авторы у пациентов с олигоастенозооспермией и азооспермией [15-17].

Важными представляются результаты исследования A. Momeni и соавт., в котором, помимо экспрессии семейства miR-34, оценивалась степень метилирования промотора гена, кодирующего соответствующую микроРНК. В работе выявлено не только значимое снижение его экспрессии в группе бесплодных мужчин, но и большая степень метилирования промотора (82,4% против 23,3%) [12]. К сходным выводам относительно микроРНК 449 приходят R. Najafpour и соавт. Так, при достоверно более низкой экспрессии miR-449-b ($p = 0.0001$), частота метилирования промотора была выше в опытной группе (60,8% против 23,3%) [13]. C. Burgos и соавт. полагают, что влияние экспрессии miR-34 на фертильность может быть обусловлено воздействием на PI3K/AKT/mTOR сигнальный путь [20].

Другой микроРНК, анализ экспрессии которой был проведен в настоящей работе, стала miR-135a. Результаты исследования продемонстрировали не только значимое снижение её экспрессии у пациентов основной группы, но достоверное влияние на эмбриологический этап программ ВРТ. Среди других работ, оценивавших роль miR-135a, можно выделить исследование Y. Daneshmandpour и соавт., в которой помимо роли микроРНК 34b, описана ассоциация микроРНК 135a с олигозооспермией [8], а также работу W. Li и соавт., в которой авторы выявили связь miR-135a с астенозооспермией [21]. Y. Al-Mawlah и соавт. также подтвердили наличие достоверной разницы в экспрессии микроРНК 135 в эякуляте бесплодных мужчин в сравнении с фертильными донорами [22].

Одна из оцениваемых в нашем исследовании — miR-20a, была выбрана, основываясь на данных G. Cito и соавт., которые обнаружили существенное изменение экспрессии miR-20a-5p в крови у пациентов с необструктивной азооспермией [23]. Результаты нашего исследования не подтверждают эти выводы, так как не обнаружено достоверной корреляции

изменений экспрессии в эякуляте опытной и контрольных групп.

Заключение

Идиопатическое мужское бесплодие по-прежнему остается одной из существенных проблем, с которыми сталкивается современная медицина на пути совершенствования методов экстракорпорального оплодотворения. Понимание сути этой проблемы имеет решающее значение для предоставления нуждающимся в ней парам шанса завести ребенка [5, 24]. Молекулы микроРНК, отобранные нами для исследования, продемонстрировали не только потенциальную способность быть использованными в качестве диагностического маркера мужской инфертильности, но и способность отражать эффективность процессов оплодотворения и формирования эмбриона. Вместе с тем, для полного обоснования возможности использования малых нуклеиновых кислот необходимо провести дополнительные исследования для выявления типов микроРНК, вовлеченных в эти процессы, механизмов их действия, а также возможности модуляции процесса их экспрессии, что может изменить исходы процедуры ВРТ для этих пациентов.

Литература

(п.п. 1-5; 7-8; 10-24 см. References)

6. Галимов Ш.Н., Ахметов Р.М., Галимова Э.Ф., Байрамгулов Ф.М., Биккулова Л.Р. Молекулярные аспекты влияния комплекса Сперотон на мужскую фертильность при идиопатическом бесплодии. *Урология*. 2017; 2: 88-92. <https://doi.org/10.18565/urol.2017.2.88-929>
9. Громенко Ю.Ю., Громенко И.Д., Галимова С.Ш., Галимова Э.Ф., Громенко Д.Д., Булыгин К.В. и др. Роль и место микроРНК в патогенезе бесплодия. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2023; 22(6): 65-72. <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2023-6-65-72>

References

1. Cox C., Thoma M., Tchangalova N., Mburu G., Bornstein M., Johnson C., et al. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open*. 2022; 2022(4): hoac051. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
2. Sun H., Gong T., Jiang Y., Zhang S., Zhao Y., Wu QJ. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(23): 10952-91. <https://doi.org/10.18632/aging.102497>
3. Levine H., Jorgensen N., Martino-Andrade A., Mendiola J., Weksler-Derri D., Jolles M., et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Hum Reprod Update*. 2023; 29(2): 157-76. <https://doi.org/10.1093/humup/dmac035>

4. Ferlin A., Garolla A., Ghezzi M., Selice R., Palego P., Caretta N., et al. Sperm count and hypogonadism as markers of general male health. *Eur Urol Focus*. 2021; 7(1): 205-13. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.08.001>
5. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C., Henkel R., Vij S. Male infertility. *Lancet*. 2021; 397(10271): 319-33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
6. Galimov Sh.N., Akhmetov R.M., Galimova E.F., Bairamgulov F.M., Bikkulova L.R. Molecular aspects of the impact of the speron complex on the male fertility in idiopathic infertility. *Urologiya*. 2017; 2: 88-92. <https://doi.org/10.18565/urol.2017.2.88-92> (in Russian)
7. Esteves S. Are specialized sperm function tests clinically useful in planning assisted reproductive technology? *Int Braz J Urol*. 2020; 46(1): 116-23. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IB-U.2020.01.03>
8. Daneshmandpour Y., Bahmanpour Z., Hamzei H., Mazaheri Moghaddam M., Mazaheri Moghaddam M., Khademi B., et al. MicroRNAs association with azoospermia, oligospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia: a systematic review. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Apr; 37(4): 763-75. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01674-9>
9. Gromenko Yu.Yu., Gromenko I.D., Galimova S.Sh., Galimova E.F., Gromenko D.D., Bulygin K.V., et al. Role and place of microRNAs in the pathogenesis of infertility. *Voprosy Ginekologii, Akusherstva i Perinatologii*. 2023; 22(6): 65-72. <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2023-6-65-72> (In Russian)
10. Barbu M., Thompson D., Suci N., Voinea S., Cretoiu D., Predescu D. The roles of MicroRNAs in male infertility. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(6): 2910. <https://doi.org/10.3390/ijms22062910>
11. Zhou Q., Guo X., Zhang W., Zhou J., Yang C., Bian J., et al. Expressions of miR-525-3p and its target gene SEMG1 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Andrology*. 2019; 7: 220-7. <https://doi.org/10.1111/andr.12573>
12. Momeni A., Najafipour R., Hamta A., Jahani S., Moghbelinejad S. Expression and methylation pattern of hsa-miR-34 family in sperm samples of infertile men. *Reprod Sci*. 2020; 27(1): 301-8. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00025-4>
13. Najafipour R., Momeni A., Yousefipour F., Mousavi S., Moghbelinejad S. Underexpression of hsa-miR-449 family and their promoter hypermethylation in infertile men: a case-control study. *Int J Reprod Biomed*. 2021; 19(1): 23-34. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i1.8177>
14. Eikmans M., Anholts J., Blijleven L., Meuleman T., van Beelen E., van der Hoorn M-LP., et al. Optimization of microRNA acquisition from seminal plasma and identification of diminished seminal microRNA-34b as indicator of low semen concentration. *IJMS*. 2020; 21(11): 4089. <https://doi.org/10.3390/ijms21114089>
15. Khadhim M., Manshd A. Association between microRNA expression and risk of male idiopathic infertility in Iraq. *Rev Assoc Med Bras*. 2023; 69(9): e20230341. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20230341>
16. Finocchi F., Pelloni M., Balercia G. Seminal plasma miRNAs in Klinefelter syndrome and in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Mol Biol Rep*. 2020; 47: 4373-82. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05552-x>
17. Mokánszki A., Molnár Z., Varga Tóthné E., Bodnár B., Jakab A., Bálint B., et al. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males. *Hum Fertil Camb Engl*. 2020; 23(4): 246-55. <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1562241>
18. Joshi M., Sethi S., Mehta P., Kumari A., Rajender S. Small RNAs, spermatogenesis, and male infertility: a decade of retrospect. *Reprod Biol Endocrinol*. 2023; 21(1): 106. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01155-w>
19. Pantos K., Grigoriadis S., Tomara P., Louka I., Maziotis E., Pantou A., et al. Investigating the role of the microRNA-34/449 family in male infertility: a critical analysis and review of the literature. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 709943. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.709943>
20. Burgos C., Cikutovic R., Alarcón M. MicroRNA expression in male infertility. *Reprod Fertil Dev*. 2022; 34(12): 805-18. <https://doi.org/10.1071/RD21131>
21. Li W., Zhang L., Yin X., Yu T. Expression of miR-135a-5p and its target gene JAK2 in spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Andrologia*. 2021; 53(11): e14214. <https://doi.org/10.1111/andr.14214>
22. Al-Mawlah Y., Al-Darraj M., Al-Imari M. Study of small non-coding RNA (miRNA) expression pattern of fertile/infertile male semen. *Acta Inform Med*. 2022; 30(3): 205-12. <https://doi.org/10.5455/aim.2022.30.205-212>
23. Cito G., Coccia M., Salvianti F., Fucci R., Picone R., Giachini C., et al. Blood plasma miR-20a-5p expression as a potential non-invasive diagnostic biomarker of male infertility: A pilot study. *Andrology*. 2020; 8(5): 1256-64. <https://doi.org/10.1111/andr.12816>
24. Galimov Sh.N., Gromenko J.Y., Bulygin K.V., Galimov K.Sh., Galimova E.F., Sinelnikov M.Y. The level of secondary messengers and the redox state of NAD⁺/NADH are associated with sperm quality in infertility. *J Reprod Immunol*. 2021; 148: 103383. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103383>

Сведения об авторах:

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

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

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

Гилязова Ирина Ришатовна, канд. биол. наук, доцент, каф. медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России; ст. науч. сотр., «Институт биохимии и генетики» УФИЦ РАН;

Галимов Камиль Шамильевич, канд. мед. наук, ассистент каф. патофизиологии, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет);

Громенко Дарья Дмитриевна, ординатор, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Ткаченко Серафима Витальевна, студентка, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Литвицкий Петр Францевич, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

© Коллектив авторов, 2025

УДК 615.31,616.03,616.61-006

Кузеванова А.Ю.¹, Апанович Н.В.¹, Халмурзаев О.А.², Макарова Д.М.¹, Апанович П.В.¹, Матвеев В.Б.², Логинов В.И.^{1,3}, Алимов А.А.¹**Ингибирование экспрессии гена *LGALS9* активирует Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность в опухоли почки**¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», 115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 24;³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Поиск новых подходов иммунотерапии рака почки является актуальной задачей, решение которой будет способствовать улучшению качества лечения и снижению доли больных с иммуноопосредованными нежелательными явлениями. В этой связи разработка новых лекарственных средств на основе механизма РНК-интерференции представляется одним из перспективных направлений для решения поставленной задачи, в частности для расширения спектра терапевтических мишеней с целью подавления молекулярных механизмов ускользания клеток опухоли от действия иммунного надзора. Одной из таких мишеней является ген *LGALS9*. **Цель** исследования – провести анализ уровня экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в образцах ткани рака почки, полученных от российских больных. Оценить потенциальный эффект ингибирования экспрессии гена *LGALS9* в клетках первичной опухоли почки на усиление опосредованного Т-клеточного цитолиза при совместном культивировании.

Методика. Оценку уровня экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в парных образцах опухоль/норма проводили с использованием количественной ПЦР. Аутологичные Т-лимфоциты выделяли из цельной крови больного, полученной за 2 ч до начала хирургического лечения. Первичную культуру клеток опухоли получали в течение 2-х ч после хирургического лечения. Липосомальный перенос РНК-дуплексов к генам *LGALS9* и *CD274* проводили за 24 ч до внесения аутологичных Т-лимфоцитов. Цитотоксический эффект оценивали с использованием биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США) по прошествии 24-х часов совместного культивирования.

Результаты. На выборке из 108 парных образцов показано, что повышение уровня экспрессии гена *LGALS9* наблюдается значительно чаще, чем повышение уровня экспрессии гена *CD274*. Разработанные миРНК к генам *LGALS9* и *CD274* обеспечили эффективное подавление экспрессии обоих генов. Применение липосомальных препаратов, на основе разработанных миРНК способствовало активации цитотоксических свойств аутологичных Т-лимфоцитов у пациентов, в опухоли которых имела место повышенная экспрессия гена *LGALS9*. Показано, что опосредованный Т-клеточный цитолиз может быть активирован после внесения в культуру липосомальных комплексов с миРНК к гену *LGALS9*.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале подавления экспрессии гена *LGALS9* в клетках опухоли почки для активации цитотоксического действия Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: РНК-интерференция; миРНК; *LGALS9*; *CD274*; рак почки; Т-лимфоциты; цитолиз

Для цитирования: Кузеванова А.Ю., Апанович Н.В., Халмурзаев О.А., Макарова Д.М., Апанович П.В., Матвеев В.Б., Логинов В.И., Алимов А.А. Ингибирование экспрессии гена *LGALS9* активирует Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность в опухоли почки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 49–57.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.49-57

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, общее руководство работой, научное редактирование текста – Алимов А.А.; сбор и описание клинических образцов, клиническая работа с пациентами – Халмурзаев О.А., клиническая работа с пациентами – Матвеев В.Б.; сбор и обработка материала, написание текста – Кузеванова А.Ю., Апанович Н.В.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Кузеванова А.А., Апанович П.В.; научное редактирование текста – Логинов В.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кузеванова Анна Юрьевна, e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru;

Алимов Андрей Анатольевич, e-mail: andrei.alimov2010@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.10.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Kuzevanova A.Yu.¹, Apanovich N.V.¹, Khalmurzaev O.A.², Makarova D.M.¹, Apanovich P.V.¹, Matveev V.B.², Loginov V.I.^{1,3}, Alimov A.A.¹

Inhibition of *LGALS9* gene expression activates T cell-mediated cytotoxicity in renal tumor

¹Research Center for Medical Genetics, 1 Moskvorechye St., Moscow, 115522, Russian Federation;

²Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russian Federation;

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltijskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation

The search for new approaches to immunotherapy of renal cancer is an urgent task. Solving this problem will improve the quality of treatment and reduce the proportion of patients with immune-mediated adverse events. Thus, the development of new drugs based on the principles of RNA interference is promising for expanding the range of therapeutic targets to overcome the immune escape of tumors. One of such targets is the *LGALS9* gene. **The aims of the study** were 1) to evaluate the expression levels of *CD274* and *LGALS9* genes in samples of renal cancer tissue from patients in Russia and 2) to determine the potential effect of inhibition of *LGALS9* gene expression in primary renal cancer cells on enhancing T cell-mediated cytotoxicity during co-culturing.

Methods. The expression level of *CD274* and *LGALS9* genes in paired tumor/normal samples was assessed using quantitative PCR. Autologous T lymphocytes were isolated from the whole blood obtained two hours before the start of surgery. Primary cancer cell culture was obtained within two hours after surgery. siRNA was delivered to tumor cells 24 hours before the administration of autologous T lymphocytes. The cytotoxic effect was assessed by RTCA xCELLigence biosensor technology (ACEA Biosciences, USA) after 24 hours of co-culturing.

Results. The study examined 108 paired clinical samples to assess the expression levels. Overexpression of the *LGALS9* gene was significantly more frequent than overexpression of the *CD274* gene. To investigate gene knockout, siRNAs against *LGALS9* and *CD274* were developed. Cell co-culture experiments showed that T cell-mediated cytotoxicity could be activated by the addition of siRNA-loaded liposomal complexes to the cell culture.

Conclusion. The study results evidenced a therapeutic potential for co-suppression of the *LGALS9* gene expression in renal tumor cells to activate the cytotoxic action of T lymphocytes.

Keywords: RNA-interference; siRNA; *LGALS9*; *CD274*; renal cancer; T lymphocytes; cytotoxicity

For citation: Kuzevanova A.Yu., Apanovich N.V., Khalmurzaev O.A., Makarova D.M., Apanovich P.V., Matveev V. B., Loginov V.I., Alimov A.A. Inhibition of *LGALS9* gene expression activates T cell-mediated cytotoxicity in renal tumor. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 49–57. (In Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.49-57

Author's contribution: concept and design of the study, general management of the study, writing the text – Alimov A.A.; collection and description of clinical samples, clinical work with patients – Khalmurzaev O.A., Matveev V.B.; collection and processing of material, writing the text – Kuzevanova A.Yu., Apanovich N.V.; preparation of illustrative material, statistical processing – Kuzevanova A.Yu., Apanovich P.V.; final editing – Loginov V.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

For correspondence: **Anna Yu. Kuzevanova**, researcher, Research Center for Medical Genetics, 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115522, Russian Federation, e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru;

Andrei A Alimov, Ph.D. biol. sciences, PhD, doctor of medicine, associate prof., head of molecular genetics of complex inherited diseases laboratory the Research Center for Medical Genetics, 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115522, Russian Federation, e-mail: andrei.alimov2010@yandex.ru

Information about the authors:

Kuzevanova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>

Apanovich N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9221-115X>

Khalmurzaev O.A., <https://orcid.org/0000-0001-7500-1815>

Apanovich P.V., <https://orcid.org/0000-0001-6576-5512>

Matveev V. B., <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>

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

Alimov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>

Financing. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centers for Medical Genetics.

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

Received 21.10.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

В терапии онкологических заболеваний, наряду с цитостатическими препаратами, низкомолекулярными ингибиторами протеинкиназ и гормональными лекарственными средствами, широкое применение получили ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКТИ), в частности, моноклональные антитела (МКА) к белкам CTLA-4, PD-1, PD-L1, которые являются продуктами генов *CTLA4*, *PDCD1* и *CD274* соответственно. Согласно клиническим рекомендациям по лекарственному лечению почечноклеточного рака [1] широкое применение получили ингибиторы киназ (сунитиниб, акситиниб и др.) и ИКТИ (ниволумаб, пембролизумаб и др.), а также их комбинации. Появление в арсенале химиотерапевтов ИКТИ способствовало значительному улучшению эффективности лечения отдельных групп больных. Однако, для значительной части больных, данная тактика лечения является нерезультативной [2]. Кроме того, при применении препаратов данной группы с высокой частотой наблюдаются иммуноопосредованные нежелательные явления 3–4 степени, что способствует инициации исследований по поиску новых терапевтических подходов.

Открытие молекулярных механизмов, лежащих в основе РНК-интерференции, положило начало разработке новых таргетных препаратов, действующим веществом которых являются малые интерферирующие РНК (миРНК). Механизм РНК-интерференции рассматривается в качестве перспективного терапевтического подхода для широкого спектра заболеваний. Начиная с 2018 г., несколько синтетических олигонуклеотидных препаратов (патистиран, гивосиран, лумасиран и инклизисан) одобрены FDA (Food and Drug Administration) [3] для лечения амилоидной полинейропатии, острой печеночной порфирии, первичной гипероксалурии 1 типа и гиперхолестеринемии, соответственно.

Одним из способов доставки миРНК в клетки является липофекция, основанная на использовании в качестве носителя липидных наночастиц [4]. В настоящее время одобрены более десятка препаратов, содержащих липосомы в качестве системы доставки фармакологических агентов различной химической природы. В частности, создание липосомальных форм противоопухолевых препаратов доксорубин (Doxil) [5], иринотекан (ONIVYDE) [6] и паклитаксел (Lipusu) [7], способствовало снижению токсичности и увеличению максимально переносимой дозы действующих веществ в сравнении с аналогичными химиопрепаратами, применяемыми в растворимой форме.

В настоящее время активно изучаются перспективы использования липосомальной доставки миРНК в клетки опухоли в качестве принципиально новых лекарственных средств. В частности, проводятся клинические испытания липосомальной миРНК *Atu027* для лечения больных на поздних стадиях рака поджелудочной железы, печени, толстой кишки, яичников и меланомы [8].

Одной из потенциальных иммунотерапевтических мишеней при светлоклеточном почечно-клеточном раке (скПКР) является ген *LGALS9*, кодирующий белок галектин-9 (Gal9). Экспериментально доказано, что гибель CD8+Т-клеток, инфильтрующей опухоль, может быть инициирована в результате взаимодействия лиганда Gal9 с рецептором TIM3 активированных Т-клеток [9]. Повышенные уровни экспрессии галектина-9 и его рецептора TIM3 показаны для многих типов опухолей, включая рак молочной железы, рак головы и шеи, рак толстой кишки и другие типы рака [10–14]. При раке почки нередко наблюдается повышенная экспрессия опухолевыми клетками продуктов генов *CD274* и *LGALS9*, что является одной из причин формирования пула антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, неспособных к цитотоксической функции [15]. Показана ассоциация между высокой экспрессией галектина-9 и худшей общей выживаемостью в группе пациентов скПКР на III–IV стадиях [16].

В настоящей работе проанализированы частоты повышения уровня экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* на выборке российских больных раком почки. Проведена оценка возможности активации опосредованного Т-клеточного цитолиза при ингибировании экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* в первичной культуре клеток опухоли почки.

Методика

Формирование выборки образцов и выделение РНК.

Образцы ткани почки (опухолевая ткань и морфологически нормальная ткань той же почки) были получены и клинически охарактеризованы в «НИИ клинической онкологии» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всего было исследовано 108 парных образцов ткани. В выборку вошли 62 мужчин и 46 женщины. Средний возраст больных составил 60,1 года. Согласно патоморфологической оценке, исследуемая выборка состояла из светлоклеточного почечно-клеточного рака ($n=100$), папиллярного рака ($n=4$) и онкоцитомы ($n=4$). Аутологичные Т-лимфоциты выделяли из цельной крови больного, полученной за 2 ч до начала хирургического лечения. Первичную культуру клеток опухоли получа-

ли в течение 2-х ч после хирургического лечения. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с принципами Хельсинкской декларации ВМА.

Суммарную фракцию РНК из образцов ткани и культуры клеток линии Рпоч1КК выделяли общепринятым способом с использованием реагента «ExtractRNA» (Евроген, Россия). Образцы дополнительно обрабатывали ДНКазой I, после чего проводили очистку с использованием набора «CleanRNA Standard» (Евроген, Россия). Качество выделенной РНК проверяли при помощи электрофоретического разделения в 1,8% агарозном геле. Концентрацию РНК в водном растворе оценивали спектрофотометрически.

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Синтез комплементарной цепи ДНК осуществляли с использованием набора реагентов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия). Относительное определение уровня представленности транскрипта в образце проводили с использованием стандартного оборудования и программного обеспечения компании Applied Biosystems QuantStudio (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген *GAPDH*. Оценку экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* проводили с использованием набора праймеров опубликованных ранее [17]. Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по $\Delta\Delta Ct$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее, чем в 2 раза ($|\Delta\Delta Ct| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений.

Получение первичной культуры клеток и фракции Т-клеток. Первичную культуру опухолевых клеток из ткани опухоли почки получали общепринятым методом с использованием коллагеназы в стандартных стерильных условиях клеточного бокса [18]. Клетки культивировали в ростовой среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 1% инсулина-трансферрина-селенита (ИТС), эпидермальный фактор роста (EGF) (5 мкг/мл) и 1% пенициллина-стрептомицина.

Фракцию Т-клеток периферической крови получали из мононуклеарных клеток с использованием стандартного набора EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Активацию Т-лимфоцитов проводили с помощью антител к CD3 (functional grade, Cat. No. 16-0037-81) и CD28 (functional grade, Cat. No. 16-00289-81) (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

Перед постановкой экспериментов, с помощью стандартного набора EasySep™ Dead Cell Removal (Annexin V) Kit (STEMCELL Technologies, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя, осуществляли удаление мертвых клеток из популяции. Оценку количества и жизнеспособности клеток в обогащенной фракции проводили с использованием счетчика Countess II FL (Life Technologies, США), клетки окрашивали раствором трипанового синего (0,4%).

Загрузка миРНК на липосомальный вектор. В качестве липосомального вектора использовали катионные липосомы 2x3-DOPE [19]. Загрузку миРНК на липосомы производили непосредственно перед использованием в эксперименте. В частности, приготовленные на бессывороточной среде Opti-MEM™ (Gibco™, Thermo FS, США) растворы дуплексов и липосомальной дисперсии смешивали в равных объемах после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин и вносили в культуру клеток.

Культивирование и трансфекция клеток линии Рпоч1КК. Перевиваемая клеточная линия светлоклеточного рака почки человека Рпоч1КК получена из коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина [20]. Клетки Рпоч1КК культивировали в стандартных условиях в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 1 нМ пирувата натрия, 1% пенициллина-стрептомицина в клеточном CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Перед трансфекцией клетки перевиваемой линии, а также клетки первичной культуры опухоли почки высевали в планшеты в концентрации $4,0 \cdot 10^4$ клеток в 1 мл среды за 24 ч до обработки. Перед внесением композиции миРНК и катионного липида питательную среду с 10% сывороткой заменяли на ту же среду с 1% сывороткой без антибиотиков. Конечная концентрация дуплекса, загруженного на липосомальный вектор, в зависимости от задачи эксперимента, составляла 25 нМ или 50 нМ. Через 6 ч после трансфекции меняли среду на RPMI-1640, с содержанием 10% FBS и 1 нМ пирувата натрия (для клеток перевиваемой линии) или 10% FBS, 1 % ИТС, EGF (5 мкг/мл) (для клеток первичной культуры). Эффективность РНК-интерференции оценивали через 24 и 48 ч методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). В качестве контролей сравнения использовали те же клетки без обработки тестируемым препаратом. В экспериментах с МКА был использован авелумаб в конечной концентрации 15 мкг/мл [21]. Последовательно олигонуклеотидов представлены ниже:

миLGALS9-s: rGrGrAUrCUUrGUrGUrGrArArGr-CUrCrAdTdT

миLGALS9-a: UrGrArGrCUUrCrArCrArCrArArGrAUrCrCdTdT

миCD274-s: rGrGrAUrCrCrArGUrCrArCrCUrCUrGrArAdTdT

миCD274-a: UUrCrArGrArGrGUrGrArCUrGrGrAUrCrCdTdT

Совместное культивирование клеток опухоли почки с активированными аутологичными Т-лимфоцитами. Через 24 ч после трансфекции клеток первичной культуры опухоли почки в соответствующие лунки вносили активированные аутологичные Т-лимфоциты в количестве 1:1 в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 1% ИТС, EGF (5 мкг/мл).

Оценка опосредованного Т-клеточного цитолиза. Оценку изменения показателя «клеточный индекс» проводили через 24 ч совместного культивирования опухолевых клеток и Т-лимфоцитов с применением биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Регистрацию сигнала осуществляли с помощью пакета программ RTCA Software Lite v.2.2.5. так, как это было описано ранее [22].

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2019.

Результаты

Экспрессия целевых генов у больных раком почки.

Материал для исследования и клинические характери-

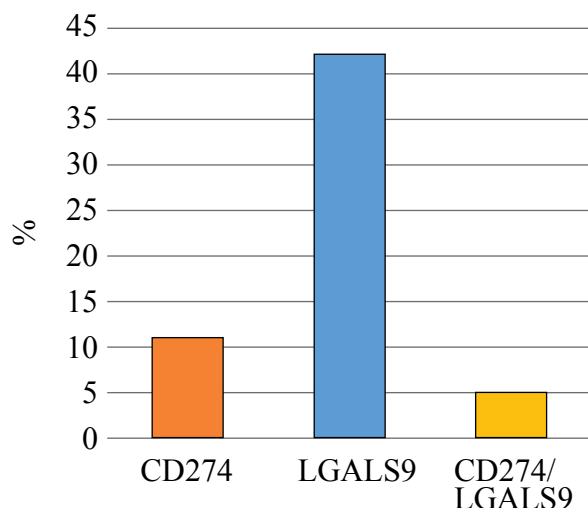


Рис. 1. Доля образцов опухолевой ткани с повышенным уровнем экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в выборке тканей опухоли почки, полученных от 108 больных.

Fig. 1. Percentage of tumor tissue samples with increased expression levels of the *CD274* and *LGALS9* genes in renal tumor tissue obtained from 108 patients.

стики были получены в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Оценили частоты повышенной экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* при помощи количественной ОТ-ПЦР. Было исследовано 108 парных образцов (опухоль/норма) ткани почки. Данные по гистологии изучаемых образцов получены из отдела патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ.

На исследуемой выборке провели анализ уровней экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в опухолевой ткани по сравнению с гистологической нормой. Повышенным считали уровень экспрессии гена в опухоли, отличающийся в 2 и более раз от экспрессии в нормальной ткани. Результаты анализа представлены на **рисунке 1**.

В результате проведенной оценки выявили, что увеличение уровня экспрессии гена *LGALS9* встречается значительно чаще, чем увеличение уровня экспрессии гена *CD274*. Совместная повышенная экспрессия обоих генов составила порядка 5%. Полученные результаты позволяют предположить, что ген *LGALS9* является потенциальной терапевтической мишенью при опухоли почки, что требует экспериментального подтверждения.

Тестирование миРНК к генам *LGALS9* и *CD274* на модели перевиваемой клеточной линии рака почки.

На первом этапе исследования определили концентрацию разработанных миРНК для эффективного подавления экспрессии генов *LGALS9* и *CD274*. Для этого использовали клетки перевиваемой клеточной линии светлоклеточного рака почки человека Рпоч1КК. Эффективность ингибирования оценивали через 24 и 48 ч после проведения трансфекции. Было показано, что увеличение концентрации миРНК с 25 до 50 нМ не приводило к усилению эффективности нокдауна гена *LGALS9* (**рис. 2, а/а**). В то время как для гена *CD274* максимальное ингибирование экспрессии было получено при концентрации миРНК 50 нМ (**рис. 2, б/б**). На основании этого в дальнейших экспериментах с клетками опухоли почки, полученных от больных, использовали для нокдауна гена *LGALS9* миРНК в концентрации 25 нМ, а для гена *CD274* в концентрации 50 нМ.

Совместное культивирование аутологичных Т-лимфоцитов и клеток опухоли больных после ингибирования генов *LGALS9* и *CD274*. Опосредованный Т-клеточный цитолиз оценивали по результатам совместного культивирования так, как это было описано ранее [21]. В связи с особенностями используемого в экспериментах биологического материала, оценку уровня экспрессии тестируемых генов в образцах опухоли проводили параллельно с экспериментами по трансфекции.

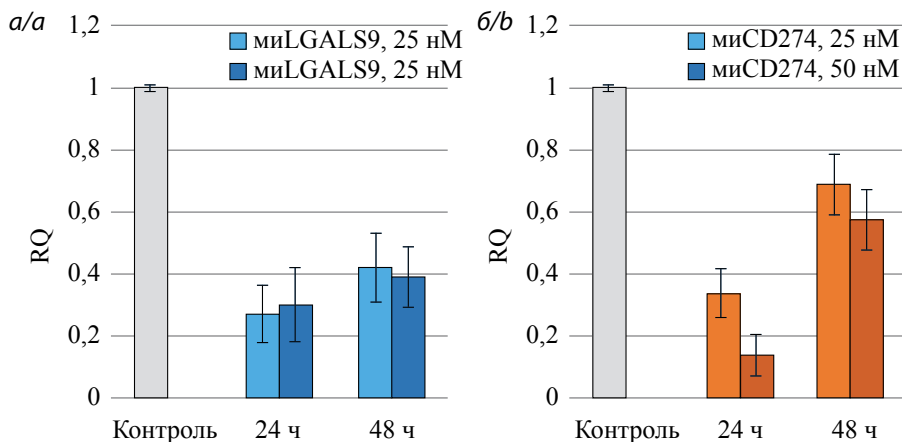


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов *LGALS9* (a/a) и *CD274* (b/b) в клетках линии Rpoch1KK через 24 и 48 ч после трансфекции ми*LGALS9* или ми*CD274* в концентрациях 25 нМ и 50 нМ.

Fig. 2. Relative expression level of the *LGALS9* (a/a) and *CD274* (b/b) genes in Rpoch1KK cells 24 and 48 hours after transfection with si*LGALS9* or si*CD274* at concentrations of 25 nM and 50 nM.

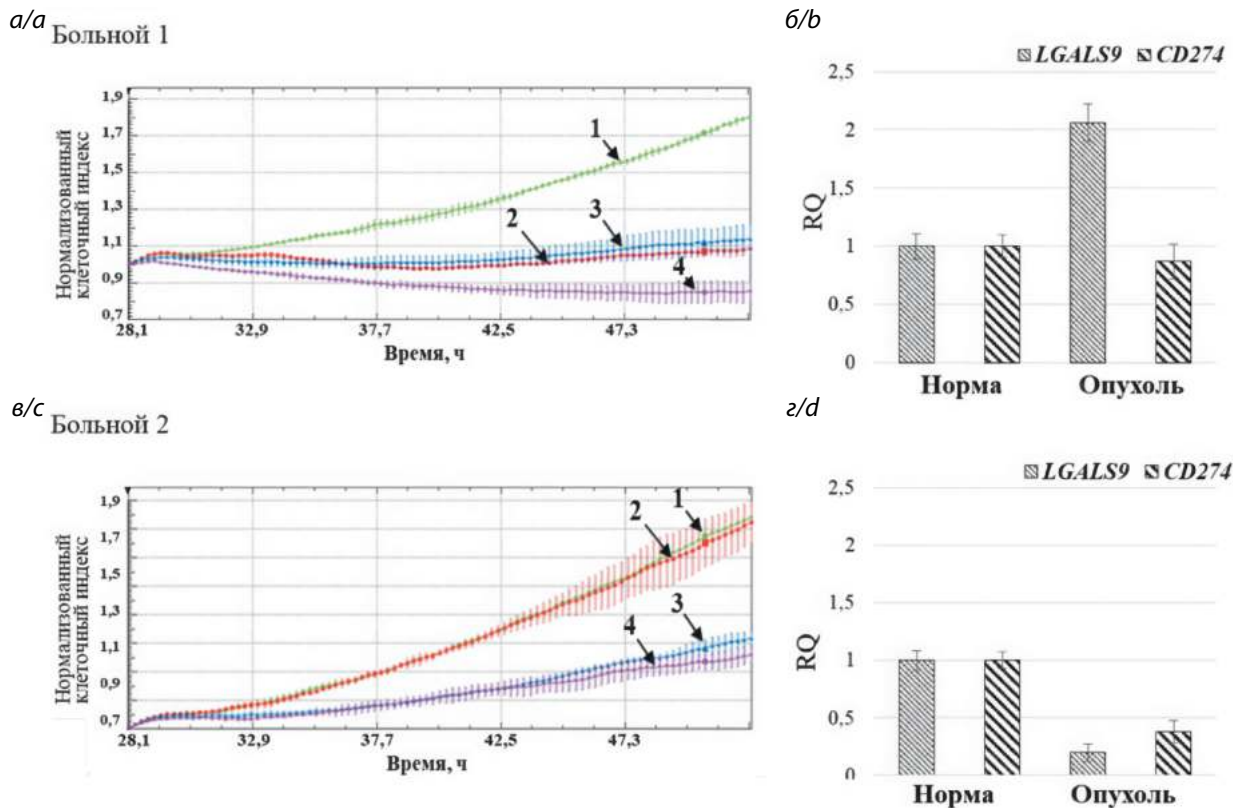


Рис. 3. Результаты исследования биоматериала двух больных.

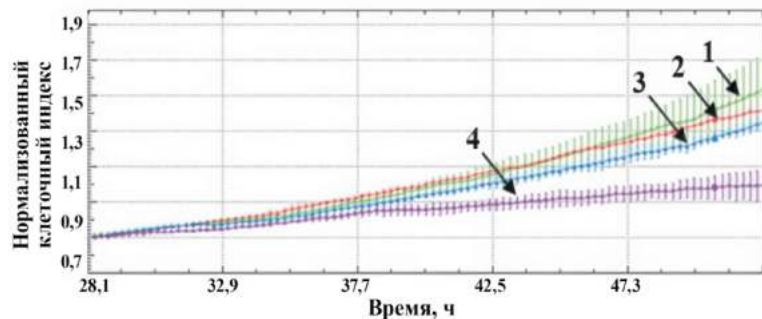
a/a и v/c – опосредованный Т-лимфоцитами цитолиз клеток опухоли почки. 1 – клетки опухоли, 2 – клетки опухоли + активированные Т-лимфоциты (1:1), 3 – клетки опухоли + ми*LGALS9*/ми*CD274*, 4 – клетки опухоли + ми*LGALS9*/ми*CD274* + активированные Т-лимфоциты (1:1); b/b, z/d – относительный уровень экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* в парных образцах ткани почки.

Fig. 3. Biomaterial assay data from two patients.

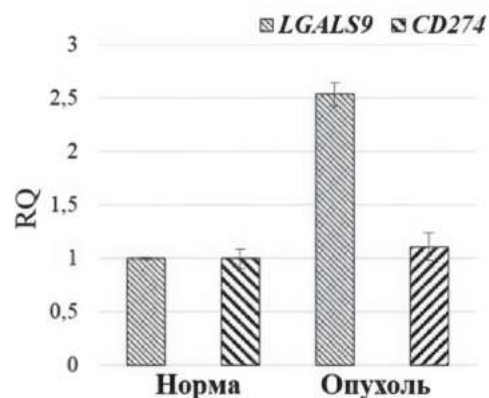
a/a and v/c – T-lymphocyte-mediated cytolysis of renal tumor cells. 1 – tumor cells, 2 – tumor cells + activated T lymphocytes (1:1), 3 – tumor cells + si*LGALS9*/si*CD274*, 4 – tumor cells + si*LGALS9*/si*CD274* + activated T lymphocytes (1:1); b/b, z/d – relative expression level of the *LGALS9* and *CD274* genes in paired kidney tissue samples.

a/a

Больной 3

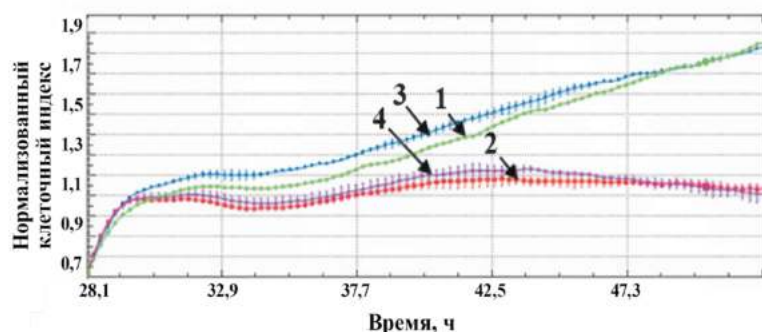


б/б



в/с

Больной 4



з/д

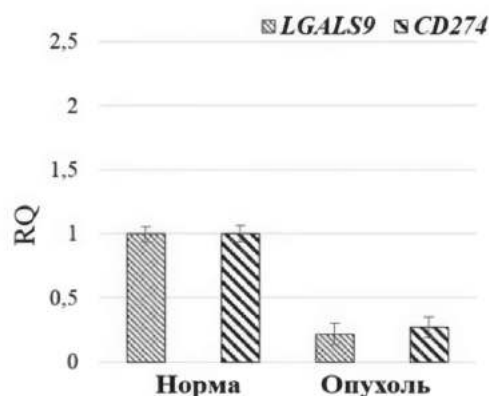


Рис. 4. Результаты исследования биоматериала двух больных.

a/a, б/б – опосредованный Т-лимфоцитами цитолиз клеток опухоли почки в присутствии авелумаба. 1 – клетки опухоли, 2 – клетки опухоли + активированные Т-лимфоциты (1:1), 3 – клетки опухоли + миLGALS9, 4 – клетки опухоли + миLGALS9 + активированные Т-лимфоциты (1:1); б/б, з/д – относительный уровень экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* в парных образцах ткани почки.

Fig. 4. Biomaterial assay data from two patients.

a/a, в/с – T-lymphocyte-mediated cytolysis of renal tumor cells in the presence of avelumab. 1 – tumor cells, 2 – tumor cells + activated T lymphocytes (1:1), 3 – tumor cells + siLGALS9, 4 – tumor cells + siLGALS9 + activated T lymphocytes (1:1); б/б, з/д – relative expression level of the *LGALS9* and *CD274* genes in paired kidney tissue samples.

При оценке модулирующего действия гена *LGALS9* на аутологичные Т-лимфоциты, дополнительно подавляли экспрессию гена *CD274* с целью оценить потенциально возможный совместный эффект.

Было показано, что трансфекция клеток опухоли комбинацией дуплексов миLGALS9/миCD274 способна активировать Т-клеточную цитотоксичность (рис. 3, a/a). В частности, эффект наблюдали при совместном культивировании Т-клеток и клеток опухоли, полученных из ткани рака почки, в которой методом количественной ОТ-ПЦР был зарегистрирован повышенный уровень экспрессии гена *LGALS9* (рис. 3, б/б).

В образце сравнения, полученном из ткани с низким уровнем экспрессии целевых генов, при тех же условиях культивирования эффект обнаружен не был (рис. 3 в/с, з/д).

В дополнение к полученным результатам было отмечено, что данная комбинация препаратов способствует снижению пролиферативной активности в популяциях клеток первичной опухоли вне зависимости от присутствия Т-клеток. Поэтому в следующей серии экспериментов миРНК к гену *CD274* заменили на МКА против PD-L1 (авелумаб), что позволило снизить цитотоксический эффект при совместном ингибировании обоих лигандов (рис. 4, a/a, б/б).

В следующей серии экспериментов трансфекция клеток опухоли дуплексом миLGALS9 осуществлялась в присутствии антител против PD-L1, что способствовало активации Т-клеточной цитотоксичности (рис. 4, а/а). В эксперименте использовали опухолевые клетки, выделенные из ткани рака почки с повышенным уровнем экспрессии гена *LGALS9* (рис. 4, б/б).

В образце сравнения, полученном из ткани с низким уровнем экспрессии целевых генов, при тех же условиях культивирования эффект не наблюдали (рис. 4, в/с, г/д). Следует отметить, что в этом случае, был выявлен цитотоксический эффект аутологических Т-лимфоцитов, не связанный с действием препаратов, что, вероятно, является результатом иммуногенного действия первичной опухоли, инициировавшей специфический иммунный ответ в организме больного до проведения хирургического лечения.

Заключение

Поиск дополнительных терапевтических мишеней для иммунотерапии опухоли препаратами ИКТИ является актуальной задачей, поскольку цитотоксическое действие Т-клеток может быть обусловлено моделирующим действием не одной, а нескольких молекул, наличие которых на поверхности опухолевой клетки невозможно предсказать. В нашем исследовании показано, что в ткани опухоли почки частота совместной экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* составляет 5% случаев. Повышенная экспрессия гена *LGALS9* является преобладающей. В экспериментах при совместном культивировании клеток опухоли, полученных из ткани почки с повышенным уровнем экспрессии гена *LGALS9*, и Т-клеток больного показано, что применение липосомальных комплексов с миРНК к гену *LGALS9* способствует активации цитотоксического действия эффекторных Т-клеток. Полученные данные представляют интерес при планировании дальнейших исследований данной области.

Литература

(п.п. 2–12; 14–16; 18; 19; 21 см. References)

1. Волкова М.И., Носов Д.А., Алексеев Б.Я., Гладков О.А., Матвеев В.Б. Практические рекомендации по лекарственному лечению почечноклеточного рака. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1. *Злокачественные опухоли*. 2023; 13(3s2-1): 609–19. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-609-619>
13. Кипкеева Ф.М., Мансорунов Д.Ж., Музаффарова Т.А., Апанович Н.В., Никулин М.П., Алимов А.А. Иммунные контрольные точки PD-1/PD-L1 и TIM-3/Gal-9 и перспективы их совместного ингибирования. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(2): 202–11. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2024-70-2-202-211>

17. Апанович Н.В., Апанович П.В., Халмурзаев О.А., Матвеев В.Б., Алимов А.А. Экспрессия генов иммунных контрольных точек при прогрессии рака почки. *Медицинская генетика*. 2023; 22(11): 13–9. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.13-19>
20. Лушникова А.А., Морозова Л.Ф., Абрамов И.С., Дубровина Т.С., Балбуцкий А.В. Генетические изменения в линии Рпоч1-КК светлоклеточного рака почки человека. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3(3): 81–5. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2016-3-3-81-85>
22. Кузеванова А.Ю., Халмурзаев О.А., Борунова А.А., Апанович Н.В., Заботина Т.Н., Алимов А.А. и др. Анализ действия Т-лимфоцитов периферической крови больного на клетки почечно-клеточного рака в модельных системах. *Онкоурология*. 2022; 18(4): 15–24. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2022-18-4-15-24>

References

1. Volkova M.I., Nosov D.A., Alekseev B.Ya., Gladkov O.A., Matveev V.B. Practical recommendations for drug treatment of renal cell cancer. RUSSCO practical recommendations, part 1. *Zlokachestvenny'e opuxoli*. 2023; 13(3s2-1): 609–19. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-609-619> (in Russian)
2. Negishi T., Furubayashi N., Nakagawa T., Nishiyama N., Kitamura H., Hori Y., et al. Site-specific Response to Nivolumab in Renal Cell Carcinoma. *Anticancer research*. 2021; 41(3): 1539–45. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14913>
3. Zhang C., Ma Y., Zhang J., Kuo J.C., Zhang Z., Xie H., et al. Modification of Lipid-Based Nanoparticles: An Efficient Delivery System for Nucleic Acid-Based Immunotherapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2022; 27(6):1943. <https://doi.org/10.3390/molecules27061943>
4. Albertsen H.C., Kulkarni J.A., Witzigmann D., Lind M., Petersson K., Simonsen J.B. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022; 188, 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>
5. Barenholz Y. Doxil® – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012; 160(2): 117–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
6. Paz-Ares L., Spigel D.R., Chen Y., Jove M., Juan-Vidal O., Rich P., et al. RESILIENT part 1: a phase 2 dose-exploration and dose-expansion study of second-line liposomal irinotecan in adults with small cell lung cancer. *Cancer*, 2022; 128(9):1801–1811. <https://doi.org/10.1002/cncr.34123>
7. Zhang J., Pan Y., Shi Q., Zhang G., Jiang L., Dong X., et al. Pacitaxel liposome for injection (Lipusu) plus cisplatin versus gemcitabine plus cisplatin in the first-line treatment of locally advanced or metastatic lung squamous cell carcinoma: A multicenter, randomized, open-label, parallel controlled clinical study. *Cancer Commun (Lond)*, 2022; 42(1): 3–16. <https://doi.org/10.1002/cac2.12225>
8. Schultheis B., Strumberg D., Santel A., Vank C., Gebhardt F., Keil O., et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2014; 32(36): 4141–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.55.0376>
9. Yang R., Sun L., Li C.F., Wang Y.H., Yao J., Li H., et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2021; 12(1): 832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>

10. Yasinska I.M., Sakhnevych S.S., Pavlova L., Teo Hansen Selno A., Teuscher Abeleira A.M., Benlaouer O., et al. The Tim-3-Galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1594. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01594>
11. Liu J.F., Wu L., Yang L.L., Deng W.W., Mao L., Wu H., et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37(1): 44. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0713-7>
12. Kang C.W., Dutta A., Chang L.Y., Mahalingam J., Lin Y.C., Chiang J.M., et al. Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Sci Rep.* 2015; 5:15659. <https://doi.org/10.1038/srep15659>
13. Kipkeeva F.M., Mansorunov D.Z., Muzaffarova T.A., Apanovich N.V., Nikulin M.P., Alimov A.A. Immune checkpoints PD-1/PD-L1 and TIM-3/GAL-9 and prospects for their simultaneous inhibition. *Voprosy Onkologii.* 2024; 70(2): 202–11. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2024-70-2-202-211> (in Russian)
14. Lv Y., Ma X., Ma Y., Du Y., Feng J. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes Dis.* 2022; 10(6): 2366–82. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.020>
15. Granier C., Vinatier E., Colin E., Mandavit M., Dariane C., Verkarre V., et al. Multiplexed Immunofluorescence Analysis and Quantification of Intratumoral PD-1+Tim-3+CD8+ T Cells. *J. Vis. Exp.* 2018; (132): e56606, <https://doi.org/10.3791/56606>
16. Jikuya R., Kishida T., Sakaguchi M., Yokose T., Yasui M., Hashizume A., et al. Galectin-9 expression as a poor prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2020; 69(10): 2041–51. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02608-6>
17. Apanovich N.V., Apanovich P.V., Khalmurzaev O.A., Matveev V.B., Alimov A.A. Expression of immune checkpoint genes during kidney cancer progression. *Meditsinskaya genetika.* 2023; 22(11): 13–9. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.13-19> (in Russian)
18. Valente M.J., Henrique R., Costa V.L., Jerónimo C., Carvalho F., Bastos M.L., et al. A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS one.* 2011; 6(5), e19337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019337>
19. Vysochinskaya V., Shishlyannikov S., Zabrodskaia Y., Shmendel E., Klotchenko S., Dobrovolskaya O., et al. Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells. *Pharmaceutics.* 2022; 15(1):8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010008>
20. Lushnikova A.A., Morozova L.F., Abramov I.S., Dubrovina T.S., Balbutskiy A.V. Genetic alterations in the human kidney clear cell carcinoma line Рноч1-КК. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2016; 3(3): 81–5. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2016-3-3-81-85> (in Russian)
21. Grenga I., Donahue R.N., Lepone L.M., Richards J., Schlom, J. A fully human IgG1 anti-PD-L1 MAb in an *in vitro* assay enhances antigen-specific T-cell responses. *Clin Transl Immunology.* 2016; 5(5): e83. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.27>
22. Kuzevanova A.Yu., Khalmurzaev O.A., Borunova A.A., Apanovich N.V., Zabolotina T.N., Alimov A.A., et al. Study of the action of peripheral blood T-lymphocytes on renal cell carcinoma cells in model systems. *Onkourologiya.* 2022; 18(4): 15–24. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2022-18-4-15-24> (in Russian)

Сведения об авторах:

Кузеванова Анна Юрьевна, науч. сотр. лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова», e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru;

Апанович Наталья Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»;

Халмурзаев Ойбек Авазханович, канд. мед. наук, науч. сотр., врач — онколог, отд-ние онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Макарова Дарья Максимовна, мл. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»;

Апанович Павел Васильевич, науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»;

Матвеев Всеволод Борисович, доктор мед. наук, проф., зам. директора по инновационной деятельности, зав. отд. онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России, член-кор. РАН;

Логинов Виталий Игоревич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»; вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Алимов Андрей Анатольевич, канд. биол. наук, PhD, доцент, зав. лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова».

© Коллектив авторов, 2025

УДК 616-092.9

Шарикадзе Д.Т.¹, Габитов М.В.¹, Лобанов А.В.², Гребенчиков О.А.¹, Кузовлев А.Н.¹

Изучение влияния хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов после черепно-мозговой травмы

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

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

Введение. Черепно-мозговая травма – актуальная проблема XXI века, находящаяся на стыке социально-правовых и медицинских наук. Научный поиск препарата, способного улучшить клинический исход заболевания, несомненно, является приоритетной задачей. **Цель работы** – изучить влияние хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов при моделировании открытой черепно-мозговой травмы (ОЧМТ) у крыс.

Методика. Эксперименты проведены на крысах-самцах Вистар, разделенных на группы: 1) Интактные; 2) Контроль; 3) ОЧМТ+Литий 63 мг/кг. Исследование выполнено с помощью оценки уровня мРНК в мозге крыс для генов провоспалительных цитокинов IL-1beta, IL-6 и TNF-α методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Моделирование ОЧМТ статистически значимо повышало уровень IL-1beta в перифокальной зоне повреждения головного мозга крыс до 339 ± 45 отн. ед. в сравнении с интактной группой ($p=0,007$), а применение хлорида лития статистически значимо снижало уровень IL-1beta по отношению к группе Контроль ($p=0,001$). Моделирование ОЧМТ статистически значимо повышало уровень IL-6 в перифокальной зоне травматического повреждения до 155 ± 15 отн. ед. в сравнении с интактным мозгом ($p=0,04$). Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг статистически не значимо снижало уровень IL-6 по отношению к группе Контроль ($p=0,08$). Моделирование ОЧМТ статистически значимо повышало уровень TNF-α в перифокальной зоне травматического повреждения до 129 ± 32 отн. ед. в сравнении с интактным мозгом ($p=0,04$). Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг не влияло на уровень TNF-α по отношению к группе Контроль ($p=0,1$).

Заключение. Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг после открытой черепно-мозговой травмы у крыс статистически значимо снижает уровень цитокина IL-1beta.

Ключевые слова: литий; цитокины; IL-1beta; IL-6; TNF-α; нейропротекция; ЧМТ

Для цитирования: Шарикадзе Д.Т., Габитов М.В., Лобанов А.В., Гребенчиков О.А., Кузовлев А.Н. Изучение влияния хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов после черепно-мозговой травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 58–64.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.58-64

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

Для корреспонденции: Шарикадзе Денис Тамазович, e-mail: critical_care@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось по государственному заданию. Тема: FGWS-2022-0001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.12.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Sharikadze D.T.¹, Gabitov M.V.¹, Lobanov A.V.², Grebenchikov O.A.¹, Kuzovlev A.N.¹

The effect of lithium chloride on the level of pro-inflammatory cytokines after traumatic brain injury

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

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

Background. Traumatic brain injury (TBI) is an urgent problem of the 21st century lying at the confluence of socio-legal and medical sciences. The scientific search for a drug capable of improving the clinical outcome of the disease is undoubtedly a priority task. **Aim.** To study the effect of lithium chloride on the concentration of pro-inflammatory cytokines in a rat model of TBI.

Methods. Experiments were performed on male Wistar rats divided into three groups: 1) intact rats, 2) control, and 3) TBI+lithium 63 mg/kg. The brain concentrations of mRNA of the IL-1 beta, IL-6 and TNF-α pro-inflammatory cytokine genes were measured by real-time PCR.

Results. Modeled TBI significantly increased the concentration of IL-1beta in the perifocal zone of brain injury to 339 ± 45 conv. units in comparison with the intact group ($p=0.007$), while the use of lithium chloride significantly decreased the concentration of IL-1beta compared to the control group. Modeled TBI significantly increased the concentration of IL-6 in the perifocal zone of traumatic injury to 155 ± 15 conv. units compared to the intact brain ($p=0.04$). Administration of lithium chloride 63 mg/kg insignificantly reduced the concentration of IL-6 compared to the control group ($p=0.08$). Modeled TBI significantly increased the concentration of TNF- α in the perifocal zone of traumatic injury to 129 ± 32 conv. units compared to the intact brain ($p=0.04$). Lithium chloride 63 mg/kg left unchanged the TNF- α concentration compared to the control group ($p=0.1$).

Conclusion. Administration of lithium chloride at a dose of 63 mg/kg to rats after TBI significantly reduced the concentration of IL-1beta cytokine.

Keywords: lithium; cytokines; IL-1beta; IL-6; TNF- α ; neuroprotection; TBI

For citation: Sharikadze D.T., Gabitov M.V., Lobanov A.V., Grebenchikov O.A., Kuzovlev A.N. The effect of lithium chloride on the level of pro-inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 58–64. (in Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.58-64

Author's contribution: concept and design of the study – Kuzovlev A.N.; collection and processing of material, preparation of illustrative material, writing the text – Sharikadze D.T.; editing the text – Grebenchikov O.A., Gabitov M.V., Lobanov A.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Denis T. Sharikadze, applicant of the Department of General Pathology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, e-mail: critical_care@mail.ru

Information about the authors:

Sharikadze D.T., <https://orcid.org/0000-0002-7288-4170>

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

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

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

Kuzovlev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>

Financing. The study was funded by a government contract. Subject: FGWS-2022-0001.

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

Received 06.12.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) — актуальная проблема XXI века, находящаяся на стыке нескольких специальностей, таких как, травматология и нейрохирургия, реаниматология и реабилитология, юриспруденция и социальная гигиена. Все они вовлечены в решение архиважных задач, касающихся не только лечения, но и предотвращения травматизма среди взрослого и детского населения [1–3].

Острые критические состояния, к которым относятся ЧМТ, имеют несколько вариантов прогноза, т.е. выход из критического состояния, переход в хроническое состояние и реже — летальный исход, поэтому большая часть больных нуждается в пролонгированном протезировании витальных функций и непрерывной интенсивной терапии. Из этого следует, что пациенты после тяжёлых травматических повреждений головного мозга нуждаются в длительном дорогостоящем специализированном лечении [4].

Обращая внимание на исследовательские работы последних 5 лет, можно сказать, что молекулярные механизмы первичных и вторичных повреждений головно-

го мозга при ЧМТ продолжают изучаться [5–7]. Первичное повреждение происходит во время травмы и является прямым результатом внешнего воздействия, вызывающего деформацию ткани мозга, нарушая его физиологические функции. В течение нескольких минут после травматической агрессии начинается патологический каскад биохимических и клеточных реакций, включая отек головного мозга и повышение внутричерепного давления, которые вызваны многофакторным набором событий, включая эксайтоксичность глутамата, митохондриальную дисфункцию, нейровоспаление, перекисное окисление липидов, поломку структур ДНК и апоптоз. Важно отметить, что именно нейровоспаление занимает доминирующую позицию в активации провоспалительных цитокинов [8–9]. Последние, вырабатываются в основном микроглией, а также астроцитами, нейронами и эндотелиальными клетками, которые, в свою очередь активируют глиальные клетки, замыкая патологический круг. К цитокинам, концентрации которых повышаются при ЧМТ, относятся IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α . По данным Т. Вудкока и соавт., увеличение уровня IL-6 в крови коррелирует с тяжестью травмы, являясь плохим прогностическим признаком. Повышен-

ные концентрации IL-8, IL-10 и TNF- α также наблюдаются после ЧМТ, но их корреляция с исходами травмы не подтверждена [10]. В исследовании Стайна Д.М. и соавт., умеренная и тяжелая гипоперфузия головного мозга у больных с ЧМТ сопровождалась высоким уровнем IL-8 в сыворотке крови [11].

Тяжелая травма головного мозга может приводить к непреднамеренно длительным воспалительным процессам, фагоцитозу и астроглиозу. По данным исследований *in vitro* известно, что в нейроваскулярной единице астроциты синтезируют оксида азота, а наиболее чувствительными к окислительному стрессу являются нейроны [12, 13].

Хлорид лития — российский препарат, обладающий кардиопротекторными и нейропротекторными свойствами в экспериментах на животных. Он способен влиять на гликоген-синтазу киназу 3 (GSK-3), мишень рапамицина млекопитающих (mTOR), глутаматные рецепторы (GluR), нейротрофический фактор мозга (BDNF), сигнальный путь Wnt [14-19].

Согласно результатам недавнего исследования было установлено, что применение хлорида лития в безопасных дозах (21 мг/кг и 63 мг/кг) после моделирования фокальной ишемии у крыс способствовало значительному уменьшению как очага инсульта, так и перифокального отека [20].

На основании вышесказанного можно утверждать, что научный поиск лекарственного препарата, способного улучшить клинический исход черепно-мозговой травмы, несомненно, является приоритетной задачей медицинского сообщества.

Цель исследования — изучить влияние хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов при моделировании открытой черепно-мозговой травмы у крыс.

Методика

Все экспериментальные работы проведены согласно утверждённым правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации, а также в соответствии с рекомендациями по содержанию и использованию лабораторных животных «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», National Academy Press, США 2011. Протокол исследования был утвержденным Локальным этическим комитетом ФНКЦ РР № 3/21/7 от 27 мая 2021 г.

Моделирование открытой черепно-мозговой травмы (ОЧМТ) выполнено методом дозированного контузионного повреждения открытого мозга в условиях внутрибрюшинной анестезии хлоралгидратом 300 мг/кг

[21, 22]. После подготовки и обработки операционного поля, лабораторное животное размещали в стереотаксической раме и выполняли разрез кожи по сагиттальному шву. С помощью 5-миллиметровой фрезы выполнялось сверление отверстия в теменной и лобной костях черепа над левым полушарием в зоне расположения сенсорной коры. Ориентирование происходило по стереотаксическим координатам: 2,5 мм боковое отклонение от сагиттального шва и 1,5 мм заднее расположение относительно брегмы. Для нанесения травмы на боёк сбрасывали груз массой 50 г с высоты 10 см. Кожу головы крысы ушивали нитью Викрил 4-0 и обрабатывали 5% раствором бриллиантового зеленого. До выхода животного из наркоза температуру тела поддерживали на уровне $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Все исследования выполнены на аутбредных крысах-самцах Вистар весом 250-350 г ($n=15$). Лабораторные животные были разделены на 3 группы:

1) интактные крысы, которым проводилась только анестезия, но не выполнялось ОЧМТ (название — Интактные, $n=5$);

2) контрольная группа крыс, которым после моделирования ОЧМТ внутривенно вводился 0,9% раствор хлорида натрия (название — Контроль, $n=5$);

3) крысы, которым через 60 мин после моделирования ОЧМТ внутривенно вводился раствор хлорид лития 4,2% в дозе 63 мг/кг (название — ОЧМТ+Литий 63 мг/кг, $n=5$).

Исследование корреляции цитокинов выполнено с помощью количественной оценки уровня мРНК в мозге крыс для генов провоспалительных цитокинов IL-1beta, IL-6, TNF- α методом ПЦР в реальном времени.

Выделение РНК осуществлялось с помощью набора, предоставляемого фирмой RNeasy MiniKit (QIAGEN, США) в соответствии с протоколом к указанному набору.

Разрушение 25 мг ткани проводили с помощью пестика и ступки в жидком азоте. К гомогенату добавляли 600 мкл буфера RLT (QIAGEN, США). Гомогенизировали шприцем с иглой диаметром 0,8 мм. Лизат центрифугировали в течение 3 мин на скорости 16 100 g, супернатант переносили в другую микроцентрифужную пробирку. К супернатанту добавляли 450 мкл 96% этанола и наносили на колонку RNeasy. Связавшуюся РНК последовательно промывали 700 мкл буфера RW1, и 2 раза по 500 мкл буфера RPE. Элюцию проводили 50 мкл воды, свободной от РНКаз. Элюированную РНК пересаживали с помощью ацетата натрия (1/10 объема 3М раствора) и 96%-го этанола (2,5 объема); растворяли в 30 мкл деионизированной воды, свободной от РНКаз.

Обратная транскрипция проводилась с помощью набора SuperScript III, предоставляемого фирмой ThermoScientific (США).

Готовили смесь: олиго-(dT)₁₈ (500мкг/мл) и 50нг рандомных праймеров 1:1 (1 мкл), тотальная РНК (2 мкг), смесь 10 мМ дезоксирибонуклеотидов (1 мкл), MQ до 12 мкл. Данную смесь прогревали при температуре 65°C в течении 6 мин, затем помещали в лёд.

Добавляли 5х-буфер для транскрипции (4 мкл), 0,1 М ДТТ (2 мкл), 1 мкл обратной транскриптазы (20 units), MQ (1 мкл), инкубировали 10 мин при комнатной температуре для отжига рандомных праймеров и в течение 50 мин при температуре 43°C, затем при температуре 70°C в течении 15 мин для инактивации обратной транскриптазы.

Для выбора праймеров для ПЦР использовали программу Beacon Designer. Были использованы следующие пары праймеров (табл. 1).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ STATISTICA 13 (StatSoft. Inc., США) и GraphPad Prizm. Нормальность распределения признака в выборках оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистические различия между данными, соответствующие нормальному распределению, анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апосте-

риорным тестом Tukey для сопоставления трех и более групп или Т-критерием Стьюдента для анализа не более 2-х групп. Статистические различия в данных, имеющих хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального, анализировали с использованием U-теста Манна–Уитни с применением поправки Бонферрони для сопоставления трех и более групп или U-теста Манна–Уитни для анализа не более 2-х групп. Критерием статистической значимости был уровень $p < 0,05$.

Результаты

Черепно-мозговая травма — экстремальное повреждение вещества головного мозга, вызванное физическими факторами и сопровождающееся целым комплексом патологических каскадов и сигнальных путей. Нейровоспаление включает в себя высвобождение воспалительных медиаторов, активацию астроцитов и микроглии, при этом последняя играет решающую роль в клеточной реакции в качестве первой линии защиты.

Моделирование травмы головного мозга на животных необходимо для изучения молекулярных механизмов повреждения ЦНС и разработки эффективных терапевтических препаратов на доклиническом этапе. Для изучения влияния хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов, в рамках его нейропротекторных свойств, нами выбрана модель открытой черепно-мозговой травмы, которая известна хорошей

Таблица 1/Table 1

Последовательности и основные характеристики праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени

Sequences and main characteristics of primers used for real-time PCR

Ген / Gene	Животное / Animal	Последовательности праймеров (прямого и обратного), 5' – 3'	Температура отжига / Annealing temperature
<i>18S pPHK / 18S rRNA</i>	Крыса / Rat	GACAGGATTGACAGATTGAT	56 °C
		TTATCGGAATTAACCAGACAA	
TNF-α	Крыса / Rat	TTATCTACTCCAGGTTCT	56 °C
		TGGTATGAAATGGCAAATC	
<i>IL-1beta</i>	Крыса / Rat	AGAACATAAGCCAACAAGT	56 °C
		ACACAGGACAGGTATAGAT	
<i>IL-6</i>	Крыса / Rat	TGATTGTATGAACAGCGATGATG	56 °C
		CCAGAAGACCAGAGCAGATT	
		TCACATCACAGTAGGAAGTT	

Примечание. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе BioRad iCycler (США) в соответствии с протоколом (табл. 2) и смесью следующего состава: Смесь Б (интеркалирующий краситель Eva Green + рецессивный краситель ROX + Taq Pol + 25mM dNTP + буфер (фирма «Синтол») – 10 мкл, праймеры (смесь 10 мкМ прямого и обратного праймеров – 0,5 мкл, MQ – 9,5 мкл, продукт обратной транскрипции – 5 мкл).

Note. Real-time PCR was performed in a BioRad iCycler amplifier (USA) according to the protocol (table. 2) and a mixture of the following composition: Mixture B (intercalating dye Eva Green + recessive dye ROX + Taq Pol + 25mM dNTP + buffer (Synthol)) – 10 µl, primers (a mixture of 10 µM forward and reverse primers – 0.5 µl, MQ – 9.5 µl, reverse transcription product – 5 µl).

Таблица 2/ Table 2

Протокол ПЦР в реальном времени

Real-time PCR protocol

Период / Period	Время / Time	Температура, °C / Temperature, °C	Число циклов / Number of cycles
Инициация / Initiation	5 мин / 5 min	95	1
Денатурация / Denaturation	1 мин / 1 min	95	45
Отжиг / Annealing	20 с / 20 sec	56	
Элонгация / Elongation	20 с / 20 sec	72	
	1 мин / 1 min	72	1
Получение кривой плавления / Obtaining a melting curve	30 с / 30 sec	Каждые 30 с температура повышается на 0,5 °C / Every 30 sec the temperature rises by 0.5 °C	45

Примечание. При статистической обработке результаты анализа экспрессии нормировали на экспрессию гена 18S рРНК.

Note. During statistical processing, the results of expression analysis were normalized to the expression of the 18S rRNA gene.

Таблица 3/ Table 3

Относительный уровень мРНК IL-1beta, IL-6, TNF-α в мозге крыс, M±SEM, референсный ген 18S рРНК

Relative mRNA level of IL-1beta, IL-6, TNF-α in rat brain, M±SEM, reference gene 18S rRNA

Группа / Group	Уровень мРНК L-1beta, отн. ед. / L-1beta mRNA level, rel. units	Уровень мРНК IL-6, отн. ед. / IL-6 mRNA level, rel. units	Уровень мРНК TNF-α, отн. ед. / TNF-α mRNA level, rel. units
Интактные / intact <i>n</i> =5	154±42	104±29	85±15
Контроль / control <i>n</i> =5	339±45 *	155±15 *	129±32 *
ОЧМТ+Литий 63 мг/кг / TBI +Lithium 63 mg/kg, <i>n</i> =5	235±33 #	127±20	115±25

Примечание. Данные представлены как Mean±SD. * – *p*<0,05 для контрольной группы с моделирование ЧМТ относительно интактной группы, # – *p*<0,05 для экспериментальной группы с введением хлорида лития в дозе 63 мг/кг через 60 мин после ЧМТ относительно контрольной группы с моделирование ЧМТ. Для определения статистической значимости использовали Т-критерий Стьюдента.

Note. Data are presented as Mean±SD. * – *p*<0.05 for the control group with PMT modeling relative to the intact group, # – *p*<0.05 for the experimental group with administration of lithium chloride lithium chloride at a dose of 63 mg/kg 60 min after traumatic injury relative to the control group with modeling of traumatic injury. group with modeling of traumatic brain injury. To determine statistical significance were used Student’s T-criterion.

экспериментальной воспроизводимостью. Мы предположили, что внутривенное введение хлорида лития через 60 мин после ЧМТ может вызвать прямую корреляцию с цитокинами в головном мозге. В экспериментальном исследовании мы использовали количественную оценку уровня мРНК в мозге крыс для генов IL-1beta, IL-6, TNF-α методом ПЦР в реальном времени.

Изучение влияния хлорида лития на уровень провоспалительных цитокинов при патологических каскадах развития ЧМТ проводили в группе ОЧМТ+Литий 63 мг/кг (*n*=5) по сравнению с группой Контроль (*n*=5) и группой Интактные (*n*=5).

В результате моделирования ОЧМТ установлено статистически значимое повышение в 2,2 раза уровня провоспалительного цитокина IL-1beta в перифокаль-

ной зоне повреждения до 339±45 отн. ед. в сравнении с интактным мозгом крыс 154±42 отн. ед. (*p*=0,007). Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг статистически значимо на 30% снижало уровень IL-1beta по отношению к группе Контроль до 235±33 отн. ед. (*p*=0,001).

Моделирование ОЧМТ статистически значимо в 1,5 раза повышало уровень провоспалительного цитокина IL-6 в перифокальной зоне травматического повреждения до 155±15 отн. ед. в сравнении с интактным мозгом 104±29 отн. ед. (*p*=0,04). Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг через 60 мин после ЧМТ статистически не значимо на 17% снижало его уровень по отношению к группе Контроль до 127±20 отн. ед. (*p*=0,08) (табл. 3).

Моделирование ОЧМТ в 1,5 раза статистически значимо повышало уровень TNF-α в мозге крыс

в перифокальной зоне травматического повреждения до 129 ± 32 отн. ед. в сравнении с интактным мозгом 85 ± 15 отн. ед. ($p=0,04$). Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг статистически не влияло на его уровень по отношению к группе Контроль 115 ± 25 отн. ед. ($p=0,1$). Ниже приведены данные уровня мРНК IL-1beta, IL-6, TNF- α в мозге крыс (табл. 3).

Таким образом, применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг через 60 минут после моделирования ЧМТ статистически значимо на 30% снижало уровень провоспалительного цитокина IL-1beta ($p=0,001$), статистически не значимо на 17% снижало уровень IL-6 ($p=0,08$) и не влияло на уровень TNF- α по отношению к группе контроля ($p=0,1$) в перифокальной зоне травматического повреждения головного мозга крыс.

Обсуждение

По данным литературы, при исследовании нейропротекторных свойств хлорида лития было выявлено несколько ключевых сигнальных путей, обеспечивающих защиту мозга. Среди них, на наш взгляд, одним из важных является противовоспалительный эффект хлорида лития, что подтверждалось снижением уровня цитокина IL-1beta в нашем исследовании. Схожие данные были получены в работе П.Р. Лидса и соавт., где введение хлорида лития в дозе 1,5 ммоль/кг статистически значимо снижало уровень IL-1 β в мозге мышей после моделирования ЧМТ [23]. Однако в отличие от нашего исследования, авторы применяли 14-дневное введение хлорида лития перед моделированием черепно-мозговой травмы.

Заключение

При изучении предполагаемых нейропротекторных эффектов лития отмечено его влияние на сигнальные каскады, лежащие в основе универсальных механизмов органопротекции. Применение хлорида лития в дозе 63 мг/кг через 60 мин после моделирования открытой черепно-мозговой травмы уменьшает воспалительную реакцию, посредством снижения уровня цитокина IL-1beta. Таким образом, можно считать, что применение данного препарата способствует нивелированию посттравматических факторов черепно-мозговой травмы.

Мы убеждены в том, что данные, полученные в ходе нашего исследования, подчеркивают необходимость в продолжении экспериментальной работы, направленной на изучение нейропротекторных свойств хлорида лития. Особое внимание следует уделить определению сигнальных путей и молекулярных механизмов, которые лежат в основе его действия на процессы,

связанные с травматическим повреждением головного мозга у животных в экспериментальных условиях.

Литература

(п.п. 5; 6; 8-11; 16-19; 21; 23 см. References)

1. Рассказова В.Н., Кику П.Ф., Богданова В.Д., Волкова М.В., Паладова Л.М., Сухова А.В. Актуальные проблемы детского травматизма и его профилактики. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2022; 66(2): 138–44. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2022-66-2-138-144>
2. Ключевский В.В., Литвинов И.И. *Практическая травматология: руководство для врачей*. М.: Практическая медицина; 2020. ISBN 978-5-98811-610-3
3. Сабиров Д.М., Росстальная А.Л., Махмудов М.А. Эпидемиологические особенности черепно-мозгового травматизма. *Вестник экстренной медицины*. 2019; 12(2): 2–3.
4. Александрова Е.В., Зайцев О.С., Челябинца М.В., Шарова Е.В., Соколова Е.Ю., Гаврилов В.М. и др. Выход из затяжного бессознательного состояния вследствие тяжелого диффузного аксонального поражения головного мозга: клиническое наблюдение и обзор литературы. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2013; 5(2): 51–8. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2013-2414>
7. Порядин Г.В. *Патофизиология: общая нозология и типовые патологические процессы*. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0472-0
12. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Аверьянова Н.С., Карасева О.В., Арсеньева Е.Н., Лукьянов В.И. и др. Полиморфизм гена APOE и маркеры повреждения мозга в исходах тяжелой черепно-мозговой травмы у детей. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(4): 72–80. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012004172>
13. Стельмашук Е.В., Капкаева М.Р., Розанова Н.А., Александрова О.П., Генрихс Е.Е., Обмолов В.В. и др. Влияние индуктора нейровоспаления на компоненты нейроваскулярной единицы головного мозга *in vitro*. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2022; 108(5): 686–96. <https://doi.org/10.31857/S0869813922050107>
14. Гребенчиков О.А., Черпаков Р.А., Евсеев А.К., Ершов А.В., Кузовлев А.Н., Лончинский П.А. и др. Влияние хлорида лития на летальность и неврологический дефицит при ишемическом инсульте у крыс. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2021; 10 (4): 676–86. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-4-676-686>
15. Гребенчиков О.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Кузовлев А.Н., Ершов А.В. Кардиопротекторные свойства хлорида лития на модели инфаркта миокарда у крыс. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019; 23(2): 43–9. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2019-2-43-49>
20. Черпаков Р.А., Гребенчиков О.А. Влияние концентрации хлорида лития на его нейропротекторные свойства при ишемическом инсульте у крыс. *Общая реаниматология*. 2021; 17(5): 101–10. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-5-101-110>
22. Беда Е.Е., Габитов М.В., Гребенчиков О.А. Влияние ксенона в различных концентрациях на объём поражения головного мозга и выраженность неврологических нарушений у крыс при моделировании открытой черепно-мозговой травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(1): 26–36. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2024.01.26-36>

References

- Rasskazova V.N., Kiku P.F., Bogdanova V.D., Volkova M.V., Palladova L.M., Suhova A.V. Actual problems of child traumatism and its prevention. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2022; 66(2): 138–44. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2022-66-2-138-144> (in Russian)
- Kljuchevskij V.V., Litvinov I.I. *Practical traumatology: a manual for doctors. [Prakticheskaya travmatologiya: rukovodstvo dlya vrachej]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina. 2020. ISBN 978-5-98811-610-3 (in Russian)
- Sabirov D.M., Rosstal'naja A.L., Mahmudov M.A. Epidemiological features of craniocerebral trauma. *Vestnik ekstrennoy meditsiny*. 2019; 12 (2): 2–3. (in Russian)
- Aleksandrova E.V., Zaitsev O.S., Chelyapina M.V., Sharova E.V., Sokolova E.Y., Gavrilov V.M., et al. Emergence from protracted unconsciousness due to severe diffuse axonal brain injury: clinical observation and literature review. *Neurologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika*. 2013; 5(2): 51–8. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2013-2414> (in Russian)
- Kaur P., Sharma S. Recent advances in pathophysiology of traumatic brain injury. (*Curr. Neuropharmacol, Russian Journal*). 2018; 16(8): 1224–38. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170613083606> PMID: 28606040
- Mira R.G., Lira M., Cerpa W. Traumatic brain injury: mechanisms of glial response. *Front Physiol*. 2021; 22(12): 740939. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.740939> PMID: 34744783
- Porjadin G.V. *Pathophysiology: general nosology and typical pathological processes. [Patofiziologiya: obshchaya nozologiya i tipovye patologicheskie protsessy]*. Moscow: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0472-0 (in Russian)
- Capizzi A., Woo J., Verduzco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management. *Med. Clin. North Am*. 2020; 104: 213–38. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.11.001>
- Shively S.B., Priemer D.S., Stein M.B., Perl D.P. Pathophysiology of traumatic brain injury, chronic traumatic encephalopathy, and neuropsychiatric clinical expression. *Psychiatr. Clin. North Am*. 2021; 44: 443–58. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2021.04.003>
- Woodcock T., Morganti-Kossmann M.C. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2013; 4(4): 18. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00018>
- Stein D.M., Lindell A.L., Murdock K.R., Kufera J.A., Menaker J., Bochicchio G.V., et al. Use of serum biomarkers to predict cerebral hypoxia after severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 2012; 29(6): 1140–9. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2149>
- Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Aver'janova N.S., Karaseva O.V., Arsen'eva E.N., Luk'janov V.I., et al. APOE gene polymorphism and markers of brain damage in the outcomes of severe traumatic brain injury in children. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2020; 120(4): 72–80. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012004172> (in Russian)
- Stel'mashuk E.V., Kapkaeva M.R., Rozanova N.A., Aleksandrova O.P., Genrihs E.E., Obmolov V.V., et al. Effect of neuroinflammation inducer on components of brain neurovascular unit in vitro. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2022; 108(5): 686–96. <https://doi.org/10.31857/S0869813922050107> (in Russian)
- Grebenchikov O.A., Cherpakov R.A., Evseev A.K., Ershov A.V., Kuzovlev A.N., Lonchinskij P.A., et al. Lithium chloride effect on mortality and neurological deficits in the model of ischemic stroke in rats. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'»*. 2021; 10(4): 676–86. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-4-676-6866> (in Russian)
- Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shajhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V. Cardioprotective properties of lithium chloride in a rat model of myocardial infarction. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2019; 23(2): 43–9. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2019-2-43-49> (in Russian)
- Junde Z., Tingting L., Lu Z., Shan C., Dan Y., Yizhen Z. Lithium chloride promotes neural functional recovery after local cerebral ischaemia injury in rats through Wnt signalling pathway activation. *Folia Morphol Warsz*. 2023; 82: 519–32. <https://doi.org/10.5603/FM.a2022.0068>
- Pan H.Y., Valapala M. Regulation of autophagy by the glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci*. 2022; 1; 23(3): 1709. <https://doi.org/10.3390/ijms23031709>
- Lu K.T., Cheng N.C., Wu C.Y., Yang Y-L. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade. *Critical Care Medicine*. 2008; 36(3): 917–22. <https://doi.org/10.1097/ccm.0b013e31816590c4>
- Xiao Y., Fan M., Jin W., Li W.A., Jia Y., Dong Y., et al. Lithium chloride ameliorated spatial cognitive impairment through activating mTOR phosphorylation and inhibiting excessive autophagy in the repeated cerebral ischemia-reperfusion mouse model. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020; 20(5): 109. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9237>
- Cherpakov R.A., Grebenschikov O.A. Effect of lithium chloride concentration on its neuroprotective properties in ischemic stroke in rats. *General Reanimatology*. 2021; 17(5): 101–10. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-5-101-110>
- Feeney D.M., Boyeson M.G., Linn R.T., Murray H.M., Dail W.G. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain research*. 1981; 211(1): 67–77. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90067-6)
- Beda E.E., Gabitov M.V., Grebenschikov O.A. The effect of xenon in various concentrations on the volume of brain damage and the severity of neurological disorders in a rat model of open traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2024; 68(1): 26–36. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2024.01.26-36> (in Russian)
- Leeds P.R., Yu F., Wang Z., Chiu C.T., Zhang Y., Leng Y., et al. A new avenue for lithium: Intervention in traumatic brain injury. *ACS. Chemical Neuroscience*. 2014; 5(6): 422–33. <https://doi.org/10.1021/cn500040g>

Сведения об авторах:

Шарикадзе Денис Тамазович, соискатель ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского» ФНКЦ РР, e-mail: critical_care@mail.ru;

Габитов Михаил Валерьевич, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского» ФНКЦ РР, e-mail: gabitovm@yahoo.com;

Лобанов Александр Владимирович, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: lobanov-av@yandex.ru;

Гребенчиков Олег Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. органопротекции при критических состояниях ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского» ФНКЦ РР, e-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru;

Кузовлев Артём Николоевич, доктор мед. наук, зам. директора, руководитель ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского» ФНКЦ РР, e-mail: artem_kuzovlev@fnkcr.ru

© Коллектив авторов, 2025

УДК 612.115.3

Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А.

Коагулянтные эффекты композитов хитозана с аминокислотами (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистеин) *in vitro*

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д.1/12

Введение. Одной из проблем современной медицины и физиологии является нормализация процессов свертывания крови в организме как здорового индивидуума, так и больного, особенно в условиях гипокоагуляции. Известен полисахарид хитозан, обладающий кровоостанавливающими свойствами, сочетающимися с антиоксидантными, ранозаживляющими и др. **Цель** – получить наиболее эффективное по коагулянтным свойствам соединение хитозана с аминокислотами и изучить его влияние на систему гемостаза в условиях *in vitro*.

Методика. В исследованиях *in vitro* изучены коагулянтные свойства трех новых композитов (соединений) хитозана (ХТЗ) с аминокислотами – аспарагиновой кислотой (АК), глутаминовой кислотой (ГК), цистеином (Ц). Использованы коагулологические методы, включающие изучение первичного (тест агрегации тромбоцитов) и вторичного (тесты активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ, тромбинового времени – ТВ и протромбинового времени – ПВ) гемостаза. Забор крови у животных (крыс) производили с использованием золетил-ксилазинового наркоза (золетил 15 мг/кг, ксилазин – 8 мг/кг массы тела, в/м).

Результаты. Выявлено, что все соединения в той или иной степени проявили гемостатическое действие относительно контроля с физиологическим раствором. Активация процессов агрегации тромбоцитов максимально превышала значения в контрольной группе на 13, 16 и 25% под влиянием соединений ХТЗ-АК, ХТЗ-ГК и ХТЗ-Ц соответственно. Обнаружено, что эти композиты также в значительной степени усиливали и плазменный гемостаз. Так, ХТЗ-Ц максимально снижал тромбиновое время (ТВ) – на 32%, протромбиновое время (ПВ) – на 10% по сравнению с контролем. Композит ХТЗ-АК подавлял активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) на 14%, ПВ – на 19%, в то время как композит ХТЗ-ГК укорачивал ПВ на 25% относительно контроля.

Заключение. Наилучшим коагулянтом по влиянию на первичный гемостаз установлен композит ХТЗ-Ц, на плазменный гемостаз – ХТЗ-ГК (по влиянию на внешний путь свертывания), ХТЗ-АК (по влиянию на внутренний путь свертывания) и ХТЗ-Ц (по влиянию на общий путь свертывания крови).

Ключевые слова: коагулянты; хитозан; композиты; аспарагиновая кислота; глутаминовая кислота; цистеин; агрегация тромбоцитов; плазменный гемостаз

Для цитирования: Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А. Коагулянтные эффекты композитов хитозана с аминокислотами (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистеин) *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 65–72.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.65-72

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Ляпина Л.А.; редактирование – Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю.; определение параметров крови – все авторы. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Ляпина Людмила Анисимовна, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2025

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E., Shubina T.A.

Coagulant effects of chitosan composites with amino acids (aspartic acid, glutamic acid, cysteine) *in vitro*

Lomonosov Moscow State University, 1/12 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. One of the problems of modern medicine and physiology is the normalization of blood clotting processes in both healthy individuals and patients, especially in the conditions of hypocoagulation. The polysaccharide chitosan is known for its combination of hemostatic, antioxidant, wound healing, etc., properties. **The aim** was to obtain the most effective compound of chitosan (CHTZ) with amino acids in terms of the coagulant properties and to study its effect on the hemostasis system *in vitro*.

Methods. The coagulant properties of three new composites (compounds) of CHTZ with the amino acids, aspartic acid (AA), glutamic acid (GA), and cysteine (C), were studied in *in vitro* experiments. The coagulation study methods included the tests for primary hemostasis (platelet aggregation test) and secondary hemostasis (activated partial thromboplastin time, APTT; thrombin time, TT; and prothrombin time, PT). Blood samples were withdrawn from rats under zoletyl-xylazine anesthesia (zoletyl 15 mg/kg, xylazine 8 mg/kg body weight, *i.m.*).

Results. All the studied compounds produced a hemostatic effect as compared to the control saline. The values of activated platelet aggregation exceeded the values in the control group maximally by 13, 16 and 25% under the action of the compounds CHTZ-AA, CHTZ-GA and CHTZ-C, respectively. These composites also significantly enhanced plasma hemostasis. Thus, CHTZ-C maximally reduced the TT by 32% and the PT by 10% vs. control. The CHTZ-AA composite suppressed the APTT by 14% and the PT by 19%, while the CHTZ-GA composite shortened the PT by 25% relative to the control.

Conclusion. The CHTZ-C composite was the best coagulant by the effect on primary hemostasis; the best effects on plasma hemostasis were noted for CHTZ-GA by the effect on the external coagulation pathway, CHTZ-AA by the effect on the internal coagulation pathway, and CTZ-C by the effect on the general blood coagulation pathway.

Keywords: coagulants; chitosan; composites; aspartic acid; glutamic acid; cysteine; platelet aggregation; plasma hemostasis

For citation: Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E., Shubina T.A. Coagulant effects of chitosan composites with amino acids (aspartic acid, glutamic acid, cysteine) *in vitro*. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 65–72. (In Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.65-72

Author's contribution: concept and design of the study, writing the text – Lyapina L.A.; editing the text – Grigorieva M.E., Obergan T.Yu.; determination of blood parameters – all authors. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: **Ludmila A. Lyapina**, doctor of biol. Scien., prof., Head scientific research M.V. Lomonosov State University, e-mail: lyapinal@mail.ru

Information about the authors:Lyapina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>Obergan T.Y., <https://orcid.org/0000-0002-3760-3943>Grigorieva M.E., <https://orcid.org/0000-0003-0469-3943>Shubina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-1092-8382>

Financing. The research was carried out as a part of a scientific project of the state assignment of the Lomonosov Moscow State University.

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

Received 14.01.2025

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Природный фармакологический препарат полисахарида хитозана обладает гемостатическими свойствами, сочетающимися с антимикробной активностью. Хитозан влияет на первичный (возрастание агрегации тромбоцитов) [1] и плазменный гемостаз (ускорение протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ). Он ингибирует рост бактерий до 8 дней после операции, обеспечивая подходящую среду для полезной микрофлоры

[2] и активно применяется для заживления ран благодаря своим универсальным свойствам, а именно нетоксичности, биосовместимости, биоразлагаемости, легкой перерабатываемости в различные формы (гели, пены, мембраны и шарики) и способности доставки лекарств/генов к месту назначения [3, 4]. Присутствие активных первичных аминов в структуре хитозана позволяет производить дериватизацию с использованием различных функциональных групп и, таким образом, улучшать и расширять его свойства, такие как растворимость и мукоадгезивность, что требуется для биоме-

дицинского применения. Такие производные могут использоваться с хорошими результатами в ряде областей биомедицины, включая усиление трансфекции нуклеиновых кислот в генной терапии, а также способствующих тканевой инженерии [5]. Изучено влияние хитозана на структуру и функцию свертывающих белков, в то же время в некоторых исследованиях не выявлено его значительного воздействия на АЧТВ. При этом параметры тромбоэластограммы под влиянием хитозана демонстрируют изменение процесса свертывания крови в сторону гиперкоагуляции, а полученные результаты дают важное представление о молекулярной основе биологического ответа организма на хитозан [6].

Олигосахарид хитозана (COS) известен своей уникальной биологической активностью: антиоксидантной, противоопухолевой, противовоспалительной, антибактериальной, иммуностимулирующей. Научный интерес к COS определяется возможностью его использования при производстве лекарств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и в тканевой инженерии. По сравнению с соответствующим полимером, COS имеет гораздо более высокие профили абсорбции на кишечном уровне, что обуславливает быстрый доступ к кровотоку и потенциальный контакт с компонентами крови. Он в определенной мере понижает риск гемолиза в зависимости от дозы и молекулярной массы, а необратимая агрегация тромбоцитов наблюдается при его высокой концентрации, что необходимо учитывать в процессе борьбы с кровотечениями [7].

Известно, что кровотечение может произойти как в мирной жизни (дома или во время операции), так, что более вероятно, и на поле боя. Для борьбы с чрезмерным кровотечением необходимо разрабатывать новые, высокоэффективные гемостатические средства. С этой целью специалистами различных направлений создаются фармакологические препараты на основе аминокислот, что является общепринятой практикой. Аминокислоты выполняют в организме множество функций из-за особенностей физических и химических характеристик, выражающихся в образовании белков и пептидов, выполнении роли нейромедиаторов, способности адекватной реализации функций макро- и микроэлементов, витаминов, продуктов метаболизма и пр. [8]. Интерес к аминокислотам, включаемым в соединение с хитозаном, вызван тем, что полученные биопродукты могут обладать не только свойствами, присущими хитозану, но и проявлять активности, относящиеся к аминокислотам. Кроме того, стабильность является общей проблемой как для составов с высокой, так и с низкой концентрацией, однако составы с высокой концентрацией дополнительно

усложняются увеличением их вязкости, что приводит к проблемам с их производством и введением. Для обеспечения устойчивости препаратов в организме разработчики лекарств обычно используют не только аминокислоты, но и сахара, а также поверхностно-активные вещества [9].

Был получен новый тип биосовместимых коагулянтных средств на основе хитозана посредством использования L-аспарагиновой и L-глутаминовой аминокислот в качестве сшивающих агентов. Подтверждена их высокая пористость (выше 90%) и низкая плотность (менее 0,08 г/см³). Аэрогели, созданные на их основе, были паропроницаемыми, биоразлагаемыми в присутствии лизоцима человека, обладали антиоксидантной активностью. Все образцы обладали превосходными гемостатическими свойствами при контакте с кровью человека благодаря активации тромбоцитов, подтвержденной тестами на свертываемость крови. Эти биоматериалы проявляли и антибактериальные свойства в отношении как золотистого стафилококка, так и кишечной палочки. Показано, что материалы на основе хитозана имеют большой потенциал при применении как в стерильных, так и в загрязненных условиях и не препятствуют эффективному ранозаживлению даже при замедленной коагуляции, хроническом воспалении, бактериальной инфекции и медленной пролиферации клеток [10].

Установлено, что аспарагиновая кислота (polyaspartic acid, PASA), входящая в состав гемостатического гидрогеля, включающего хитозан, может остановить кровотечение из травматической раны и значительно уменьшить кровопотерю. В целом гидрогели PASA демонстрируют большой потенциал в биомедицинском применении, особенно в раневых перевязочных материалах и в восстановлении тканей [11]. Аспарагиновая кислота относится к заменимым аминокислотам, синтезируется в организме из аспарагина. Она входит в состав животных и растительных белков, содержится в центральной нервной системе (ЦНС), особенно в головном мозге. АК обладает иммуномодулирующим действием, повышает физическую выносливость, нормализует баланс возбуждения и торможения в ЦНС и выполняет важнейшую роль в различных метаболических реакциях, способствуя трансформации углеводов в глюкозу с последующим созданием запасов гликогена, в результате чего повышается сопротивляемость организма усталости [12].

Относительно другой заменимой аминокислоты — цистеина показан её защитный эффект против липосомной и индуцированной хитозаном цитотоксичности. Результаты экспериментов свидетельствуют, что пре-

параты N-ацетилцистеина способствуют улучшению кровотока и насыщению тканей печени кислородом, повышению уровня защитных ферментов и детоксикации организма [13]. Цистеин синтезируется в организме млекопитающих из серина с участием метионина, АТФ и витамина B6. Он способствует обезвреживанию некоторых токсических веществ, защищает организм от повреждающего действия радиации, служит мощным антиоксидантом как прямого, так и непрямого действия. Цистеин и его производные могут оказывать на иммунитет как прямое, так и косвенное влияние [8]. В ряде экспериментов было показано, что его применение способствует подавлению избыточной продукции таких иммуноглобулинов, как IgE и IgG4 – маркеров аллергических и некоторых инфекционных патологий, снижению адгезии болезнетворных бактерий, подавлению выработки провоспалительных и профибротических цитокинов, а также угнетению образования и разрушению биопленок патогенных бактерий и грибов. Печень и кишечник являются основными потребителями цистеина, поэтому при его недостатке в организме их функции могут нарушаться [13].

В 2024 г. сообщалось о способности карбоксиметилхитозана в соединении с другой аминокислотой (полиглутаминовой кислотой) оказывать сверхбыстрый эффективный гемостаз при перфорации желудка и заживлении ран [14]. Глутаминовая кислота (или соль глутаминовой кислоты – глутамат) является условно незаменимой алифатической (не имеющая в структуре ароматических связей) аминокислотой. Она присутствует в организме в достаточно большом количестве (до 25%) в составе белков и различных химических веществ, а также в несвязанном свободном состоянии. Глутаминовая кислота может быть синтезирована из оксоглутаровой кислоты, образующейся при метаболизме углеводов, и биосинтезирована из ряда аминокислот, включая орнитин и аргинин. В здоровом организме глутаминовая кислота вырабатывается в достаточном количестве, но с возрастом и при наличии различных патологий у человека ее уровень может снижаться [15]. Она способствует клеточному дыханию, играет ключевую роль в производстве энергии митохондриями как в период физической активности организма, так и в период его восстановления, поддерживает и повышает уровень активности ряда ферментов.

Таким образом, создание композитов хитозана с аминокислотами нацелено на повышение его устойчивости в организме и приобретение им многих дополнительных полезных свойств. Однако детальное влияние биопродуктов на основе хитозана и аминокислот на компоненты крови до сих пор остается не-

достаточно ясным.

Цель работы – получить наиболее эффективные по коагулянтным свойствам композиты хитозана с аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, или цистеином и изучить их всестороннее влияние на систему гемостаза, включая первичный и плазменный гемостаз в условиях *in vitro*.

Методика

В работе использован хитозан водорастворимый (сукцинил хитозана), полученный по запатентованной методике из панцирей красноногих крабов в соответствии с ТУ 9284-027-11734126-08 (“Биопрогресс”, Россия), аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и цистеин отечественного производства. В опытах *in vitro* готовили композиты, включающие 5000 мкг хитозана (ХТЗ) и 100 мкг аминокислот. Получали три соединения хитозана в соотношении с аминокислотами, равном 50:1 (ХТЗ-аспарагиновая кислота (ХТЗ-АК); ХТЗ-глутаминовая кислота (ХТЗ-ГК); ХТЗ-цистеин (ХТЗ-Ц)), которые инкубировали при 37°C в течение не менее 30 мин.

Эксперименты проведены с соблюдением этических правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006) и подтверждены локальным этическим комитетом от 04.06.2019 (протокол № 2). Использовано 35 крыс-самцов Wistar массой тела 250-280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь – 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22-26°C, относительная влажность 50-70%), при свободном доступе к воде и стандартному гранулированному комбикорму (использовался стандартный рацион ООО «Лабораторкорм», Россия).

Для исследования параметров гемостаза использовали кровь здоровых животных. Взятие крови производили у животных из яремной вены (*vena jugularis*) с применением в качестве консерванта 3,8%-го цитрата натрия в соотношении 9:1. Забор крови у животных производили с использованием золетил-ксилазинового наркоза (золетил 15 мг/кг, ксилазин – 8 мг/кг массы тела, в/м). Кровь центрифугировали дважды: сначала – в течение 5 мин при 1000 об/мин для получения богатой тромбоцитами плазмы, а затем – в течение 12 мин при 2500 об/мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. Далее в отдельные пробирки собирали пул плазмы для проведения экспериментов *in vitro*.

Исследовали: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); тромбиновое время (ТВ); протромбиновое время (ПВ) в бедной тромбоцитами

плазме крови, согласно стандартным методам. Свертываемость крови изучали по тестам АЧТВ, ТВ и ПВ на анализаторе свертывания крови АСКа 2-02-“Астра” (Россия). При выполнении этих тестов к 0,1 мл пулированной плазмы добавляли по 0,05 мл (255 мкг) каждого из композитов, далее проводили исследование согласно стандартным методикам.

Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови определяли на агрегометре АЛАТ-2 220LA (“Биола”, Россия) по методу Борна с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации 10^{-6} М [16, 17]. АДФ добавляли к 0,3 мл стандартизированной по количеству тромбоцитов пулированной плазмы непосредственно в кювету после 30 с инкубации с 0,05 мл (255 мкг) каждого из композитов при 37°C при непрерывном перемешивании в кювете агрегометра. Все определения по каждому тесту осуществляли не менее трех раз.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Подчинение данных закону нормального распределения проверяли по тесту Шапиро-Уилка, поэтому далее мы использовали ANOVA. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с последующими апостериорными сравнениями (тест Ньюмена-Кейлса). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Проведенное в условиях *in vitro* исследование влияния трех разных композитов хитозана с аминокислотами показало, что все три препарата обладали эффектом, активирующим свертывание крови.

Так, композит ХТЗ-АК снижал АЧТВ на 14%, ПВ – на 19%, повышал агрегацию тромбоцитов на 13%, в то время как эквивалентная концентрация ХТЗ укорачивала АЧТВ на 9%. ПВ – на 24%, а агрегацию тромбоцитов повышала на 20% (табл. 1).

Итак, на основании проведенных в условиях *in vitro* экспериментов выявлено, что композит, включающий ХТЗ и АК, обладает способностью повышать свертывание крови по тестам АЧТВ и ПВ относительно контрольных значений, что указывает на его активирующее влияние как на внутренний, так и на внешний пути свертывания крови. Один ХТЗ оказывал в основном влияние на внешний путь свертывания крови (достоверное укорочение ПВ) (табл. 1).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что композит ХТЗ-ГК не влиял на внутренний путь свертывания крови (АЧТВ не изменялось), но оказывал влияние на внешний путь свертывания крови (ПВ укорачивалось) и повышал агрегацию тромбоцитов. Таким образом, с уверенностью можно говорить о коагулянтных эффектах композита ХТЗ-ГК относительно контроля.

Из данных табл. 3 следует, что соединение ХТЗ-Ц также проявляет коагулянтные эффекты относительно контрольного уровня. В то же время коагулянтные эффекты этого соединения сопоставимы с коагулянт-

Таблица 1/ Table 1

Изменение показателей прокоагулянтной активности при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан-аспарагиновая кислота или его составных частей ($M \pm m$)

Changes in the indicators of procoagulant activity when the chitosan-aspartic acid composite or its components are added to normal blood plasma ($M \pm m$)

Условия опыта Experience conditions	АЧТВ, % APTT, %	ТВ, % TT, %	ПВ, % PT, %	Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation, %
Композит ХТЗ-АК, группа 1 Composite CHTZ-AA, group 1	86 ± 7.0**	100 ± 0.3	71 ± 5.2**	113 ± 5.6*
АК, группа 2 AA, group 2	70 ± 3.6**	107 ± 0.5	86 ± 5.9	80 ± 7.0
ХТЗ, группа 3 CHTZ, group 3	91 ± 4.2	94 ± 0.3	76 ± 2.7**	120 ± 6.5*
Контроль NaCl, группа 4 Control NaCl, group 4	100 ± 5.2	100 ± 0.3	100 ± 2.9	100 ± 5.8

Примечание. Контроль с NaCl принят за 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой 4, значимость различий между группами 4-1,2,3.
Note. The control with NaCl was accepted as 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to group 4, the significance of the differences between groups 4-1,2,3.

Таблица 2/ Table 2

Изменение показателей прокоагулянтной активности и агрегации тромбоцитов при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан-глутаминовая или его составных частей ($M \pm m$)

Changes in indicators of procoagulant activity and platelet aggregation when adding chitosan-glutamine composite or its components to normal blood plasma ($M \pm m$)

Условия опыта Experience conditions	АЧТВ, % APTT, %	ПВ, % PT, %	Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation, %
Композит ХТЗ-ГК, группа 1 Composite CHTZ-GA, group 1	99 ± 0.88	75 ± 1.7**	116 ± 0.03*
ГК, группа 2 GA, group 2	93 ± 1.3	94 ± 2.9	109 ± 0.2
ХТЗ, группа 3 CHTZ, group 3	89 ± 5.0*	72 ± 2.9*	115 ± 5.0*
Контроль NaCl, группа 4 Control NaCl, group 4	100 ± 5.2	100 ± 2.9	100 ± 5.8

Примечание. Контроль с NaCl принят за 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой 4, значимость различий между группами 4-1,2,3.
Note. The control with NaCl was accepted as 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to group 4, the significance of the differences between groups 4-1,2,3.

Таблица 3/ Table 3

Изменение показателей прокоагулянтной активности и агрегации тромбоцитов при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан-цистеин или его составных частей ($M \pm m$)

Changes in indicators of procoagulant activity and platelet aggregation when adding chitosan-cysteine composite or its components to normal blood plasma ($M \pm m$)

Условия опыта Experience conditions	АЧТВ, % APTT, %	ТВ, % TT, %	ПВ, % PT, %	Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation, %
Композит ХТЗ-Ц, группа 1 Composite CHTZ-C, group 1	96 ± 1.5	68 ± 0.21**	90 ± 0.4**	125 ± 4.5*
Цистеин, группа 2 Cysteine, group 2	88 ± 3.2	103 ± 0.56	97 ± 0.1	77 ± 7.2
ХТЗ, группа 3 CHTZ, group 3	80 ± 0.9*	62 ± 0.7**	79 ± 2.7*	120 ± 6.5*
Контроль NaCl, группа 4 Control NaCl, group 4	100 ± 5.2	100 ± 0.3	100 ± 2.9	100 ± 5.8

Примечание. Контроль с NaCl принят за 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой 4, значимость различий между группами 4-1,2,3.
Note. The control with NaCl was accepted as 100%, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to group 4, the significance of the differences between groups 4-1,2,3.

ной активностью одного ХТЗ по влиянию на агрегацию тромбоцитов и на ПВ. Композит ХТЗ-Ц по влиянию на внутренний механизм свертывания крови более эффективен, чем один ХТЗ, так как достоверно снижает ПВ. По влиянию на общий путь свертывания композит ХТЗ-Ц, как и сам ХТЗ в эквивалентной концентрации, обладает высоким коагулянтным эффектом, активируя тромбин (по тесту ТВ).

Обсуждение

Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что при исследовании гемостазиологических

эффектов трех композитов хитозана с аминокислотами установлены их коагулянтные эффекты относительно контроля, относительно же хитозана коагулянтные эффекты всех композитов ХТЗ-АК, ХТЗ-ГК и ХТЗ-Ц были сопоставимы. Механизм гемостатического действия композитов обусловлен не только присутствием в нем коагулянта хитозана, который способствовал повышению агрегации тромбоцитов и влиял на внешний механизм свертывания крови, но и аминокислот. Так, влияние на внутренний механизм свертывания крови установлено для аспарагиновой кислоты и цистеина.

Включение аминокислот в композиты придает им стабильность [9] и возможность проявлять многие другие полезные свойства (иммунные, антиоксидантные, противотоксичные и др.) [13, 18, 19]. До сих пор остро стоит проблема борьбы с массивной кровопотерей, являющейся причиной многочисленной смертности от кровоизлияния. Лечебного воздействия коммерчески доступных биоматериалов может быть недостаточно для борьбы с чрезмерным кровотечением, поэтому продолжается поиск и разработка новых высокоэффективных комплексных гемостатических агентов [10]. Полученные в настоящем исследовании результаты по изучению созданных нами композитов хитозана с аспарагиновой кислотой или хитозана с цистеином показали наличие у них повышенных гемостатических свойств.

По результатам ряда исследований [5, 18] следует, что хитозан усиливает адгезию и агрегацию тромбоцитов: после начального (в течение 5 мин) и длительного (в течение 30 мин) контакта тромбоцитов с хитозаном. Установлено, что хитозан дозозависимо увеличивает агрегацию тромбоцитов, количество внутриклеточного свободного Ca^{2+} и экспрессию комплекса гликопротеина Пб/Ша тромбоцитов, вследствие чего хитозан можно отнести к эффективным индукторам адгезии и агрегации тромбоцитов. Мы не исключаем, что механизм наилучшего тромбоцитарного эффекта композита хитозана с цистеином подобен вышеописанному и может быть обусловлен как повышением уровня Ca^{2+} , мобилизацией и усилением экспрессии комплекса гликопротеина Пб/Ша на поверхностях мембран тромбоцитов [20], так и высвобождением факторов роста из активированных тромбоцитов [21]. В настоящее время создаются перспективные композиционные материалы на основе хитозана для применения в качестве гемостатических и ранозаживляющих средств [6, 19].

Впервые в нашей работе проведено комплексное исследование изменений показателей всех звеньев системы гемостаза (сосудисто-тромбоцитарного и плазменного) под влиянием не только хитозана, но и композитов хитозана с аминокислотами. В условиях *in vitro* повышение агрегации тромбоцитов установлено при высоких концентрациях хитозана (5 мг/мл), что относится как отдельно к хитозану, так и к его композитам с аминокислотами. Выявлено также, что параметры плазменного гемостаза изменяются в сторону активации свертывающих факторов крови внешнего пути свертывания под влиянием всех композитов хитозана с аминокислотами, но в наибольшей степени композита с глутаминовой кислотой.

Заключение

Полученные результаты указывают на потенциальные возможности препаратов на основе коагулянта хитозана совместно с аминокислотами (аспарагиновой, глутаминовой или цистеином) влиять на гемостазиологический статус организма, особенно в условиях пониженной свертываемости крови с признаками геморрагии. Созданные нами композиты хитозана с аминокислотами обладают комплексным действием на первичный и плазменный гемостаз. Механизм их коагулянтного действия обусловлен в основном влиянием на свертывающие факторы плазменного гемостаза и на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, что свидетельствует об усилении агрегации тромбоцитов. Наилучшим коагулянтом по влиянию на первичный гемостаз установлен композит хитозана с цистеином, на внешний путь свертывания плазменного гемостаза — композит с глутаминовой кислотой, на внутренний путь свертывания — композит с аспарагиновой кислотой и на и общий путь свертывания крови — композит с цистеином. Несомненно, композиты на основе хитозана могут быть отнесены к перспективным средствам для восстановления показателей гемостаза в условиях пониженной свертываемости крови.

Литература

(п.п. 1–7; 9–11; 13; 14; 18; 19; 21 см. References)

8. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. *Аминокислоты, пептиды, белки*. М.: Мир; 1985.
12. Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012; 2: 88–105.
15. Стручкова И.В., Брилкина А.А. *Аминокислоты*. Учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет; 2016.
16. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза*. М.: Ньюдиамед; 2008.
17. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансед солюшнз; 2012.
20. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-издательство; 2010.

References

1. Chou Tz.-C., Fu E., Wu C.-J., Yeh J.-H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302(3): 480–83. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00173-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00173-6)
2. Wang C.H., Cherng J.H., Liu C.C., et al. Procoagulant and Antimicrobial Effects of Chitosan in Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(13): 7067. <https://doi.org/0.3390/ijms22137067>

3. Ilyas R.A., Aisyah H.A., Nordin A.H., et al. Natural-fiber-reinforced chitosan, chitosan blends and their nanocomposites for various advanced applications. *Polymers (Basel)*. 2022; 14(5): 874. <https://doi.org/10.3390/polym14050874>
4. Moeini A., Pedram P., Makvandi P., et al. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* 2020; 233(115839). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
5. Casertari L., Vllasaliu D., Lam J.K.W., et al. Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: a review. *J. Biomaterials*. 2012; 33(30): 7565-83. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.104>
6. Zhang W., Zhong D., Liu Q., et al. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J. Biomater. Sci. Polym.* 2013; 24(13): 1549–63. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.777229>
7. Guo X., Sun T., Zhong R., et al. Effects of Chitosan Oligosaccharides on Human Blood Components. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: 1412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01412>
8. Yakubke H.D., Eshkait H., *Amino acids, peptides, proteins. [Aminokisloty, peptidy, proteiny]*. M.: Mir; 1985. (in Russian)
9. Srivastava Arvind, O'Dell Courtney, Bolessa Evon et al. Viscosity reduction and stability enhancement of monoclonal antibody formulations using derivatives of amino acids. *J Pharm Sci.* 2022; 111(10): 2848-56. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.05.011>
10. Radwan-Pragłowska J., Piątkowski M., Deineka V. et al. Chitosan-Based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties-synthesis and characterization. *Molecules*. 2019; 24(14): 2629. <https://doi.org/10.3390/molecules24142629>
11. Chen D., Liu X., Qi Y. et al. Poly(aspartic acid) based self-healing hydrogel with blood coagulation characteristic for rapid hemostasis and wound healing applications. *Colloids Surf. Biointerfaces*. 2022; 214: 112430. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112430>
12. Lysikov Yu.A. Amino acids in human nutrition. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012; 2: 88-105. (in Russian)
13. Hamedinasab H., Rezayan A.H., Jaafari M.R. et al. The protective effect of N-acetylcysteine against liposome and chitosan-induced cytotoxicity. *J Microencapsul.* 2023; 40(5): 357-365. <https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2209646>
14. Dejian B., Zheng C., Yongliang O., et al. Ultrafast self-gelling, sprayable, and adhesive carboxymethyl chitosan/poly-γ-glutamic acid/oxidized dextran powder for effective gastric perforation hemostasis and wound healing. *J. Biol. Macromol.* 2024; 254(3): 127960. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127960>
15. Struchkova I.V., Brilkina A.A. *Amino acids. Educational and methodical manual. [Aminokisloty. Uchebno-metodicheskoe posobie]*. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University; 2016. (in Russian)
16. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostics and controlled therapy of the hemostasis system. [Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза]*. M.: Newdiamed; 2008. (in Russian)
17. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anti-coagulant blood system. [Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния системы противосвертывающей системы крови]*. Moscow: Advanced Solutions; 2012. (in Russian)
18. Periyah M.H., Halim A.S., Yaacob N.S., et al. The induction of glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 by oligochitosan accelerates platelet aggregation. *Biomed. Res. Int.* 2014; (653149). <https://doi.org/10.1155/2014/653149>
19. Hu Z., Zhang D.Y., Lu S.T., et al. Chitosan-based composite materials for promising hemostatic applications. *Mar Drugs*. 2018; 16(8): 273. <https://doi.org/10.3390/md16080273>
20. Kuznik B.I. *Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostasis system in norm and pathology. [Клеточные и молекулярные механизмы системы гемостаза в норме и патологии]*. Chita: Express Publishing House; 2010. (in Russian)
21. Shen E.C., Chou T.C., Gau C.H., et al. Release of growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible biomaterial for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin. Oral. Implants. Res.* 2006; 17(5): 572–78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01241.x>

Сведения об авторах:

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

Оберган Тамара Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: tobergan@mail.ru;

Григорьева Марина Евгеньевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: mgrigorjeva@mail.ru;

Шубина Татьяна Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического ф-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: shubina-74@mail.ru

© Коллектив авторов, 2025

УДК 612.66

Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Базарный В.В.

Содержание продуктов гликооксидации в ротовой жидкости коррелирует с возрастом

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3

Введение. Считают, что одним из механизмов старения является окислительный стресс, продукты реакций которого могут быть рассмотрены как потенциальные биомаркеры старения. **Цель исследования** – оценить возрастные особенности содержания малонового диальдегида и конечных продуктов гликирования в ротовой жидкости практически здоровых лиц различных возрастных групп и их возможное значение как потенциальных биомаркеров старения.

Методика. Образцы ротовой жидкости были получены у 88 практически здоровых людей детского ($n=22$), молодого ($n=26$), зрелого ($n=20$) и пожилого ($n=20$) возраста. Методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли малоновый диальдегид (ELISA Kit for Malondialdehyde, Cloud-Clone, КНР) и конечные продукты гликирования (ELISA Kit for Advanced Glycation End Product, Cloud-Clone, КНР). Для учёта параметров разведения и вязкости ротовой жидкости непосредственно полученные результаты стандартизировались методом пересчёта на концентрацию общего белка пробы (набор Mindray, КНР).

Результаты. Уровень малонового диальдегида в ротовой жидкости не имел различий между рассмотренными возрастными группами. Содержание конечных продуктов гликирования увеличивалось у участников пожилого возраста как до стандартизации, так и после. Мы установили, что непосредственная и стандартизованная концентрации конечных продуктов гликирования коррелировали с возрастом. Методом простой линейной регрессии была охарактеризована линейная зависимость данного параметра с хронологическим возрастом.

Заключение. Выявленные возрастные особенности содержания конечных продуктов гликирования в ротовой жидкости позволяют рассматривать данные соединения в качестве потенциальных кандидатов на роль биомаркеров старения.

Ключевые слова: ротовая жидкость; старение; биомаркеры старения; малоновый диальдегид; конечные продукты гликирования

Для цитирования: Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Базарный В.В. Содержание продуктов гликооксидации в ротовой жидкости коррелирует с возрастом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 73-80.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.73-80

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Базарный В.В.; сбор данных – Копенкин М.А., Полушина Л.Г.; анализ и интерпретация данных – Копенкин М.А.; написание статьи – Копенкин М.А., Базарный В.В.; редактирование статьи – Базарный В.В., Копенкин М.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Копенкин Максим Александрович, e-mail: maximkopenkin@yandex.ru

Финансирование. Работа проводилась в рамках государственного задания «Генетические и эпигенетические основы прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека». Регистрационный номер 122120100026-3.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.10.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Kopenkin M.A., Polushina L.G., Bazarnyi V.V.

Concentrations of glycoxidation products in mixed saliva correlates with age

Ural State Medical University, 3 Repina St., Ekaterinburg, 620028, Russian Federation

Introduction. Oxidative stress is believed to be one of the mechanisms of aging, and oxidative stress products can be considered potential biomarkers of aging. The aim of this study was to evaluate age-related changes in concentrations of malondialdehyde and advanced glycation end products in mixed saliva from healthy individuals of different age groups and to assess their potential as biomarkers of aging.

Methods. Mixed saliva samples were obtained from healthy children ($n=22$), young adults ($n=26$), middle-aged adults ($n=20$) and elderly people ($n=20$). Malondialdehyde (ELISA kit for Malondialdehyde, Cloud-Clone, China) and advanced glycation end product (ELISA kits for Advanced Glycation End Products, Cloud Clone, China) were measured by solid-phase enzyme immunoassays. To account for the dilution and viscosity parameters of the mixed saliva, the results were standardized by total protein concentration of the samples using the Mindray kit (China).

Results. The concentration of malondialdehyde did not differ between the age groups. The concentration of advanced glycation end products increased in the elderly group, both before and after standardization. We found that the immediate and standard-

ized concentrations of advanced glycation products were correlated with the age. The simple linear regression method was used for characterizing the significant linear dependence on the chronological age.

Conclusion. The revealed age dependence of the concentration of advanced glycation end products in mixed saliva allows considering these compounds as potential biomarkers of aging.

Keywords: mixed saliva; aging; aging biomarkers; malondialdehyde; advanced glycation end products

For citation: Kopenkin M.A., Polushina L.G., Bazarnyi V.V. Concentrations of glycoxidation products in mixed saliva correlates with age. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 73-80. (in Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.73-80

Author's contribution: concept and design of the study – Bazarnyi V.V.; collection of material – Kopenkin M.A., Polushina L.G.; technical preparation of the material – Kopenkin M.A.; writing the text – Kopenkin M.A., Bazarnyi V.V.; editing the text – Bazarnyi V.V., Kopenkin M.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Maxim A. Kopenkin, postgraduate student, Junior Researcher of Central Research Laboratory, Ural State Medical University, e-mail: maximkopenkin@yandex.ru

Information about the authors:

Kopenkin M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6092-3734>

Polushina L.G., <https://orcid.org/0000-0002-4921-7222>

Bazarnyi V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>

Financing. The work was carried out at the expense of a state task for research work «Genetic and epigenetic foundations for predicting human ontogenesis and aging disorders». The registration number is 122120100026-3.

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

Received 21.10.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Старение характеризуется недостаточностью физиологических функций организма и увеличением вероятности смерти со временем [1]. Выделяют разнообразные характеристики этого процесса, такие как геномная нестабильность, укорочение теломер, эпигенетические нарушения, митохондриальная дисфункция, клеточное старение и, как считают, связанное с ним состояние хронического слабовыраженного воспаления (inflammaging), и многие другие [2]. Важнейшим механизмом, опосредующим развитие большинства указанных признаков старения, является окислительный стресс – патологическое состояние дисбаланса между образованием и нейтрализацией активных форм кислорода (АФК). Так, чрезмерное образование АФК, ведёт к окислительной модификации молекулярных структур клетки, таких как углеводы, липиды, белки и ДНК, их повреждению, нарушению метаболических путей, что, в частности, является одним из ключевых факторов образования сенесцентных клеток [3, 4]. В то же время окислительно-модифицированные соединения обладают антигенными свойствами, что наряду с активацией редокс-чувствительных факторов транскрипции является значимым звеном развития хронического вялотекущего воспалительного процесса [5]. Таким образом, не вызывает со-

мнения, что окислительный стресс влияет на многообразные взаимосвязанные механизмы старения. Можно сделать предположение, что некоторые составляющие реакций окислительного стресса могут иметь ценность как потенциальные биомаркеры старения – параметры, характеризующие функциональные способности организма и позволяющие прогнозировать риск развития неблагоприятных исходов [6].

Образующиеся при окислительном стрессе АФК реагируют с полиненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов клеточных мембран, вызывая реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ). В качестве продуктов ПОЛ начального этапа образуются гидроперекиси липидов – нестабильные соединения, которые распадаются на ряд вторичных продуктов, одним из которых является малоновый диальдегид (МДА). По причине стабильности и хорошей способности к диффузии МДА рассматривается как вторичный маркер окислительного стресса [7]. Было обращено большое внимание исследователей к определению МДА в контексте сердечно-сосудистых заболеваний, в частности атеросклероза, в патогенезе которого окислительный стресс является значимым фактором [8, 9]. Кроме того, такие возраст-ассоциированные заболевания как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и некоторые онкологические заболевания характеризовались увеличением содержания в плазме и сыворот-

ке крови маркеров окислительного стресса, в частности МДА, а изменения их уровня в смешанной слюне выделяло пациентов с хроническим пародонтитом [10, 11]. Некоторые авторы рассматривают МДА как биомаркер старения, другие критикуют данное мнение [12-14].

Результатом необратимой реакции гликоокисления между углеводами и свободными аминогруппами белков, липидов, нуклеиновых кислот является образование гетерогенной группы соединений – конечных продуктов гликирования (КПГ) (advanced glycation end product) [15]. Данные соединения образуются в физиологических условиях, однако окислительный стресс, гипергликемия и гиперлипидемия обуславливают их избыточную продукцию. Гликированные формы белков, липидов, ДНК дисфункциональны, что обуславливает повреждение внутриклеточных структур. Кроме того, КПГ могут действовать через специфический рецептор, активация которого посредством ядерного фактора «каппа-би» стимулирует экспрессию провоспалительных цитокинов и факторов роста [16]. Увеличение содержания КПГ сопряжено с возраст-ассоциированной патологией, характеризующейся гипергликемией, дислипидемией и окислительным стрессом, в частности сахарным диабетом, атеросклерозом, метаболическим синдромом [10]. Образование КПГ связано с прогрессированием и тяжестью хронического пародонтита через нарушение структуры коллагена и модуляцию воспалительных реакций, что клинически проявляется медленной потерей поддерживающих тканей зуба [17]. При старении увеличивается содержание КПГ в тканях, а концентрация в крови и перикардальной жидкости коррелировала с возрастом [18].

Стоматологическое здоровье определяет качество жизни в пожилом и старческом возрасте [19]. Дисфункциональные нарушения полости рта при старении характеризуются типичными изменениями – повышенной стираемостью зубов, сокращением зубного ряда, нарушением процессов заживления ран, гипосаливацией [20]. Вместе с тем, ткани полости рта подвергаются повышенной оксидантной стимуляции из-за непосредственного влияния факторов внешней среды. В старших возрастных группах наблюдается истощение антиоксидантной способности ротовой жидкости, что является дополнительным фактором риска стоматологического старения [21]. В изучении данной проблематики особую ценность представляет ротовая жидкость (РЖ) – специфический компонент ротовой полости, образующийся из секретов больших и малых слюнных желез, продуктов слизистой оболочки полости рта и десневой жидкости. Известно, что анализ

РЖ является ценным инструментом диагностики, лабораторного мониторинга, прогноза течения стоматологических заболеваний и может представлять интерес в оценке старения [22, 23]. Это обусловило цель данного исследования – оценить возрастные особенности содержания МДА и КПГ в РЖ практически здоровых лиц различных возрастных групп и их возможную роль как потенциальных биомаркеров старения.

Методика

В открытом одномоментном одноцентровом нерандомизированном исследовании были получены образцы РЖ от 88 здоровых людей. Все участники были разделены на 4 возрастные группы в соответствии со следующей возрастной периодизацией (ВОЗ): дети от 7 до 12 лет ($n=22$), молодые люди от 18 до 44 лет ($n=26$), лица зрелого возраста от 45 до 59 лет ($n=20$) и пожилые люди от 60 до 74 лет ($n=20$). Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (Helsinki, 2000). Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании. Дизайн одобрен на заседании локального этического комитета Уральского государственного медицинского университета, протокол № 8 от 21.10.2022 г.

Проведено комплексное стоматологическое обследование в клинике Уральского государственного медицинского университета. Наряду со стандартным стоматологическим осмотром определяли индекс интенсивности кариеса зубов (КПУ) – сумма кариозных, пломбированных и удалённых зубов. Чтобы учесть особенности сменного прикуса в группе детского возраста был использован аналог – индекс КПУ+кп. В качестве гигиенического индекса был использован упрощённый индекс гигиены (УИГ) (ОНИ-S, Green – Vermillion, 1964). Распространённость воспаления десны оценивали по папиллярно-маргинально-альвеолярному индексу (РМА). Методом анкетирования был охарактеризован соматический статус. Критерии включения пациентов: соответствие требованиям возрастной периодизации, клиническое подтверждение стоматологического статуса, отсутствие тяжёлой соматической патологии в стадии суб- и декомпенсации. Критерии исключения пациентов: отказ от участия в исследовании, травмы лицевого скелета, сахарный диабет 1, 2-го типа.

Все участники исследования прошли инструктаж о правилах подготовки к лабораторному исследованию РЖ. Стоматологическое обследование и получение РЖ проводилось во временном промежутке между 10 и 12 часами. Участники исследования исключали

приём пищи за 2 часа до обследования. Непосредственно перед сдачей РЖ проводилось ополаскивание полости рта чистой теплой водой. По результатам стоматологического осмотра было установлено, что ротовая полость всех участников была санирована. Отбор образцов РЖ осуществляли методом пассивного слюноотечения в микропробирку типа «эппендорф». Пробоподготовка включала этап центрифугирования с ускорением 3000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость переносили в чистые микропробирки и замораживали. Методом твердофазного иммуоферментного анализа определяли МДА (ELISA Kit for Malondialdehyde, Cloud-Clone, КНР) и КПП (ELISA Kit for Advanced Glycation End Product, Cloud-Clone, КНР). Поскольку РЖ является нестандартным материалом, для учёта разведения и вязкости результаты корректировались методом пересчёта на концентрацию общего белка пробы (набор Min-dray, КНР) [24].

Распределение данных по критерию Шапиро–Уилка было отличным от нормального, результаты представлены как медиана, 25-й - 75-й квартиль – Me (Q₁-Q₃). Сравнение номинальных данных проводили по критерию χ² Пирсона. Различия между тремя и более группами непрерывных данных оценивалось по критерию Краскела–Уоллиса, а при выявлении значимых результатов выполнялся апостериорный анализ с помощью критерия Данна с поправкой Холма–Бон-

феррони. Наличие корреляций оценивали, используя критерий Спирмена и метод простой линейной регрессии, для которого непрерывные данные преобразовывались путём вычисления логарифма по основанию 2. Статистический анализ был выполнен в среде программирования Python (3.9.12) с помощью открытых библиотек SciPy (1.7.3), scikit-posthocs (0.7.0), statsmodels (0.14.0).

Результаты

На момент проведения исследования участники находились в состоянии компенсации соматических болезней и не имели обострения хронических заболеваний. В структуре соматической патологии у детей и молодых людей преобладали болезни органов дыхания и костно-суставной системы; в зрелом и пожилом возрасте – органов кровообращения и дыхания (табл. 1).

Для объективной оценки стоматологического статуса были выполнены стоматологические индексы. Возрастная характеристика и результаты индексной оценки представлены в таблице 2. Сумма кариозных, пломбированных и удалённых зубов в зрелом и пожилом возрасте была выше, чем в детском. Участники зрелой и пожилой возрастной группы отличались более высоким значением индекса РМА по сравнению с молодыми людьми, что указывает на лёгкое воспаление дёсен. Индекс УИГ был выше в группе

Таблица 1/ Table 1

Структура соматической патологии (абс. (%))

The structure of somatic pathologies (abs. (%))

Патология / Pathology	Детский возраст / Children's age (n=22)	Молодой возраст / Young age (n=26)	Зрелый возраст / Mature age (n=20)	Пожилой возраст / Elderly age (n=20)	p
Болезни системы кровообращения, n=24 / Diseases of the circulatory system, n=24	4 (16,67)	4 (14,28)	12 (60,00)	4 (20,00)	0,052
Болезни ЖКТ, n=20 / Gastrointestinal diseases, n=20	6 (25,00)	2 (7,14)	8 (40,00)	4 (20,00)	0,283
Болезни органов дыхания, n=32 / Respiratory diseases, n=32	10 (41,67)	2 (7,14)	8 (40,00)	12 (60,00)	0,048
Болезни костей и суставов, n=20 / Diseases of bones and joints, n=20	10 (41,67)	0 (0,00)	8 (40,00)	2 (10,00)	0,006
Болезни мочеполовой системы, n=2 / Disorder of the genitourinary system, n=2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (10,00)	0,298
Болезни эндокринной системы и нарушения обмена веществ, n=16 / Diseases of the endocrine system and metabolic disorders, n=16	2 (8,33)	6 (21,43)	4 (20,00)	4 (20,00)	0,816

Таблица 2/Table 2

Клиническая характеристика

Clinical characteristics

Индекс / Index	Детский возраст / Children's age (n=22)	Молодой возраст / Young age (n=26)	Зрелый возраст / Mature age (n=20)	Пожилой возраст / Elderly age (n=20)	p
Возраст, лет / Age, years	10,00 (10,00 – 10,00)	20,00 (20,00 – 20,00) *	55,00 (51,00 – 56,00) */**	61,00 (60,00 – 64,00)*/**/**	<0,001
КПУ / DMFT	2,00 (1,80 – 2,25)	7,50 (3,50 - 9,75)	17,00 (14,00 – 21,00)*/**	21,00 (21,00 - 21,75)*/**	<0,001
РМА / RMA	31,00 (21,50 – 38,50)	15,00 (14,00 - 17,75)	36,00 (29,00 – 41,00)*	37,50 (31,00 – 39,00)*	<0,001
УИГ / OHI-S	0,90 (0,72 – 1,20)	1,60 (1,35 - 1,70)	1,90 (1,20 - 1,90)	1,90 (1,90 - 1,97)*/**	0,004

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой детского возраста, ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой молодого возраста, *** – $p < 0,05$ по сравнению с группой зрелого возраста.

Note. * – $p < 0.05$ compared to the children's age group, ** – $p < 0.05$ compared to the young age group, *** – $p < 0.05$ compared to the mature age group.

Таблица 3/Table 3

Абсолютные и стандартизованные по общему белку уровни КПП и МДА в РЖ практически здоровых людей различных возрастных групп

Absolute and corrected by the total protein concentration levels of AGE and MDA in mixed saliva from healthy different age people

Показатель / Parameter	Детский возраст / Children's age (n=22)	Молодой возраст / Young age (n=26)	Зрелый возраст / Mature age (n=20)	Пожилой возраст / Elderly age (n=20)	p
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	0,85 (0,60 - 1,02)	1,30 (0,92 - 1,40)	1,20 (1,00 - 1,60)	1,60 (1,22 - 2,15)*	0,007
МДА, нг/мл / MDA, ng/ml	156,60 (74,12 - 260,25)	160,95 (142,55 - 206,67)	113,30 (58,73 - 178,05)	162,20 (94,39 - 622,20)	0,147
Стандартизованный МДА / Corrected MDA	230,25 (112,95 - 391,60)	126,97 (110,87 - 242,13)	88,35 (54,10 - 151,37)	110,67 (57,42 - 409,81)	0,369
КПП, нг/мл / AGE, ng/ml	0,01 (0,01 - 180,12)	155,60 (0,01 - 195,40)	169,30 (164,73 - 226,67)*	648,20 (134,95 - 1272,72)*/**	<0,001
Стандартизованный КПП / Corrected AGE	0,02 (0,01 - 320,18)	121,02 (0,01 - 159,40)	136,29 (129,55 - 259,72)	171,47 (119,71 - 908,41)*/**	0,004

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой детского возраста; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой молодого возраста.

Note. * – $p < 0.05$ compared to the children's age group, ** – $p < 0.05$ compared to the young age group.

пожилого возраста по сравнению с молодыми людьми, что говорит об ухудшении гигиенического состоянии полости рта.

Мы оценили содержание КПП и МДА в РЖ практически здоровых людей. Результаты в виде непосредственно установленных значений, и стандартизованных по уровню общего белка представлены в **таблице 3**. Исследованные группы не имели отличий в содержании МДА как непосредственно, так и после стандартизации. Уровень КПП в зрелом и пожилом возрасте был выше, чем в детском и молодом. После стандартизации только группа пожилого возраста сохранила аналогичные различия.

Для оценки изменений МДА и КПП при старении была определена связь с хронологическим возрастом, результаты которой представлены в **таблице 4**. Положительно коррелировал с возрастом уровень КПП, в то время как МДА не имел какой-либо связи. Методом простой линейной регрессии было установлено, что непосредственное содержание КПП объясняло увеличение возраста на 31,00%, а стандартизованный уровень – на 26,90% (коэффициент детерминации R^2).

Обсуждение

Полученные результаты продемонстрировали, что в старших возрастных группах практически здоровых

Таблица 4/ Table 4

Связь абсолютных и стандартизованных по общему белку уровней КПП и МДА в РЖ с хронологическим возрастом
The relationship between absolute and corrected by total protein levels of AGE and MDA in mixed saliva and chronological age

Показатель / Parameter	Корреляция Спирмена / Spearman's Correlation		Простая линейная регрессия / Simple linear regression			
	Rho	<i>p</i>	<i>R</i> ²	β	95% ДИ; 95% CI	<i>p</i>
МДА, нг/мл / MDA, ng/ml	0,060	0,640	-0,013	0,030	-0,095; 0,155	0,634
Стандартизованный МДА / Corrected MDA	-0,179	0,162	-0,007	-0,046	-0,166; 0,075	0,449
КПП, нг/мл / AGE, ng/ml	0,553	<0,001	0,310	0,088	0,051; 0,126	<0,001
Стандартизованный КПП / Corrected AGE	0,376	0,007	0,269	0,085	0,046; 0,125	<0,001

людей увеличивается содержание КПП в РЖ. Образование этих соединений напрямую зависит от окислительного стресса, гипергликемии и гиперлипидемии [15, 18]. Антиокислительная способность РЖ снижается с возрастом, из-за чего окислительно-восстановительный баланс смещается в сторону образования АФК в полости рта [21]. В результате высокой продукции АФК образуются окислительно-модифицированные белки, липиды, глюкоза и другие моносахариды. Это способствует ускоренному образованию КПП. Интересно, что цепь реакций гликоокисления в свою очередь так же характеризуется образованием АФК с инактивацией антиокислительных ферментов и расходом восстановленного глутатиона и НАДФН, что позволяет говорить о формировании порочного круга [16, 18]. При старении КПП накапливаются в коже, сосудах, сердечной мышце [25, 26]. Сообщалось о связи уровней КПП в сыворотке крови и перикардиальной жидкости с возрастом [18]. Jung W.K. и соавторы моделировали ускоренное старение лабораторных животных (самцы крыс) путём введения D-галактозы, чтобы оценить изменения уровней КПП в сыворотке крови и РЖ, а также установить связь между экспрессией данного соединения в ткани слюнных желез и гипосаливацией [27]. Авторы установили, что животные с индуцированным ускоренным старением отличались от интактных более высоким уровнем КПП как в сыворотке крови, так и в РЖ. Экспрессия КПП была значительно выше в слюнных железах основной группы. Вместе с тем отмечалась выраженная экспрессия 8-оксо-2-дезоксигуанозина (маркера окислительного повреждения ДНК), снижение содержания ацинарных клеток с повышением активности апоптоза, что вело к гипофункции слюнных желез на модели ускоренно-

го старения. Таким образом, возрастная динамика содержания КПП в РЖ и экспрессия в слюнных железах соответствует таковой в крови и других тканях. Полученные в нашем исследовании данные согласуются с представлениями об изменениях КПП при старении.

В нашем исследовании отсутствовала связь между содержанием МДА и хронологическим возрастом. Данное соединение является продуктом реакций ПОЛ, рассматривается как маркер окислительного стресса и, возможно, может быть потенциальным биомаркером старения [7]. В литературе представлены данные, как указывающие на связь содержания МДА с возрастом, так и прямо противоположные. Так, уровень МДА в сыворотке крови добровольцев пожилого возраста был значительно выше, чем у лиц молодого и зрелого, однако в статье отсутствовала клиническая характеристика участников, что затрудняет геронтологическую оценку [13]. В обзоре Tsikas D. и соавторов критикуется значение МДА в оценке старения [14]. Авторы приводят аргументы в пользу того, что изменение содержания МДА в крови скорее связано с возрастным ремоделированием почек, выражаемым в увеличении концентрации креатинина при старении, чем, собственно, с возрастом. Мы не обнаружили исследований, описывающих изменения МДА в РЖ при старении, но есть сведения о его ценности в диагностике возраст-ассоциированных стоматологических заболеваний, в частности пародонтита. Сообщалось, что уровень слюварного МДА был выше при хроническом пародонтите, чем при гингивите или у здоровых людей [11]. При этом определение МДА в десневой жидкости (отделяемом десневой борозды или пародонтального кармана) отличалось большей информативностью [28, 29]. Данное обстоятельство в совокупности с тем фактом, что бак-

териальная нагрузка в пародонтальном кармане прямо коррелирует с уровнем МДА в РЖ, позволяет сделать предположение о его преобладающей роли в оценке пародонтального здоровья, а не старения [11].

Стоит отметить, что в исследовании применялся метод иммуноферментного анализа для количественного определения КППГ. Поскольку производители коммерческих тест-систем не указывают используемое антитело, а рассматриваемая группа соединений гетерогенна, это затрудняет сопоставление результатов с результатами других исследований [10].

Заключение

В настоящем исследовании оценивалось содержание МДА и КППГ в РЖ здоровых людей разных возрастных групп. Рассмотренные соединения считают косвенными маркерами окислительного стресса, а также связывают со старением. Уровень МДА не имел различий между возрастными группами, связь с хронологическим возрастом отсутствовала. Обзор литературных данных показал, что МДА скорее связан со здоровьем пародонта, чем со старением. Содержание КППГ в РЖ отличается между возрастными группами, увеличиваясь в пожилом возрасте. Мы установили положительную корреляцию уровня данного маркера с хронологическим возрастом. Это позволяет рассматривать КППГ в РЖ в качестве потенциального кандидата на роль биомаркера старения.

Литература

(п.п. 2; 4; 6–8; 10–12; 14–17; 19–22; 27–29 см.

References)

1. Моргунова Г.В., Колесников А.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. Ассоциированная со старением бета-галактозидаза – биомаркер старения, повреждения ДНК или ограничения клеточной пролиферации? *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2015; (4): 15–8.
3. Айтбаев К.А. Муркмилов И.Т., Фомин В.В. Молекулярные механизмы старения: роль окислительного стресса и эпигенетических модификаций. *Успехи геронтологии.* 2019; 32(1–2): 20–8.
5. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Шкурупиц В.А. Старение и воспаление. *Успехи современной биологии.* 2010; 130(1): 20–37.
9. Волкова М.В., Рагино Ю.И. Современные биомаркеры окислительного стресса, оцениваемые методом иммуноферментного анализа. *Атеросклероз.* 2021; 17(4): 79–92. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2021-17-4-79-92>
13. Ильяшенко К.К., Симонова А.Ю., Белова М.В., Клычникова Е.В., Биткова Е.Е., Боровкова Н.В. К вопросу о «норме» некоторых лабораторных показателей гомеостаза у людей старше 60 лет. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь».* 2021; 10(4): 787–92. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-4-787-792>
18. Емельянов В.В. Гликирование, антигликирование и дегликирование: роль в механизмах старения и геропротекции (обзор литературы). *Успехи геронтологии.* 2016; 29(3): 407–16.

23. Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В. Биохимические особенности ротовой жидкости при старении. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2024; 69(3): 108–15. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-3-108-115>
24. Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В. Изменение химических параметров ротовой жидкости при возраст-ассоциированных стоматологических заболеваниях. *Уральский медицинский журнал.* 2024; 23(3): 46–58. <https://doi.org/10.52420/umj.23.3.46>
25. Лыкова С.Г., Свечникова Е.В., Моржанаева М.А. Конечные продукты гликирования как биомаркеры старения. *Вестник РАЕН.* 2018; 18(2): 71–7.
26. Шевцова А.И., Ткаченко В.А. Конечные продукты гликирования и их рецепторы при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2019; 17(1): 11–6. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2019-17-1-11-16>

References

1. Morgunova G.V., Kolesnikov A.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Senescence-associated beta-galactosidase – a biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya.* 2015; (4): 15–8. (In Russian)
2. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023; 186(2): 243–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
3. Aitbaev K.A., Murkamilov I.T., Fomin V.V. Molecular mechanisms of aging: the role of oxidative stress and epigenetic modifications. *Uspekhi Gerontologii.* 2019; 32(1–2): 20–8. (In Russian)
4. Faraonio R. Oxidative stress and cell senescence process. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(9): 1718. <https://doi.org/10.3390/antiox11091718>
5. Zenkov N.K., Men'shikova E.B., Shkurupiy V.A. Aging and inflammation. *Uspekhi sovremennoi biologii.* 2010; 130(1): 20–37. (In Russian)
6. Chen R., Wang Y., Zhang S., Bulloch G., Zhang J., Liao H., et al. Biomarkers of ageing: Current state-of-art, challenges, and opportunities. *MedComm – Future Med.* 2023; 2: e50. <https://doi.org/10.1002/mef2.50>
7. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012; 2012: 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
8. Lee R., Margaritis M., Channon K.M., Antoniades C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem.* 2012; 19(16): 2504–20. <https://doi.org/10.2174/092986712800493057>
9. Volkova M.V., Ragino Y.I. Modern biomarkers of oxidative stress estimated by immuno-enzymal analysis. *Atherosclerоз.* 2021; 17(4): 79–92. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2021-17-4-79-92> (In Russian)
10. Frijhoff J., Winyard P.G., Zarkovic N., Davies S.S., Stocker R., Cheng D., et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(14): 1144–70. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
11. Almerich-Silla J.M., Montiel-Company J.M., Pastor S., Serrano F., Puig-Silla M., Dasí F. Oxidative stress parameters in saliva and its association with periodontal disease and types of bacteria. *Dis Markers.* 2015; 2015: 653537. <https://doi.org/10.1155/2015/653537>

12. Gil L., Siems W., Mazurek B., Gross J., Schroeder P., Voss P., et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radical Research*. 2006; 40(5): 495–505. <https://doi.org/10.1080/10715760600592962>
13. Ilyashenko K.K., Simonova A.Yu., Belova M.V., Klychnikova E.V., Bitkova E.E., Borovkov N.V. On the question of the norm of some laboratory indicators of homeostasis in people over 60. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'»*. 2021; 10(4): 787–92. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-4-787-792> (In Russian)
14. Tsikas D., Tsikas S.A., Mikuteit M., Ückert S. Circulating and urinary concentrations of malondialdehyde in aging humans in health and disease: review and discussion. *Biomedicines*. 2023; 11(10): 2744. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102744>
15. Ott C., Jacobs K., Haucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014; 2: 411–29. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016>
16. Zgutka K., Tkacz M., Tomasiak P., Tarnowski M. A role for advanced glycation end products in molecular ageing. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(12): 9881. <https://doi.org/10.3390/ijms24129881>
17. Ilea A., Băbțan A.M., Boșca B.A., Crișan M., Petrescu N.B., Collino M. et al. Advanced glycation end products (AGEs) in oral pathology. *Arch Oral Biol*. 2018; 93: 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.013>
18. Emel'yanov V.V. Glycation, antiglycation and deglycation: role in mechanisms of aging and geroprotective (literature review). *Uspekhi Gerontologii*. 2016; 29(3): 407–16. (In Russian)
19. Watanabe Y., Okada K., Kondo M., Matsushita T., Nakazawa S., Yamazaki Y. Oral health for achieving longevity. *Geriatr Gerontol Int*. 2020; 20(6): 526–38. <https://doi.org/10.1111/ggi.13921>
20. Lamster I.B., Asadourian L., Del Carmen T., Friedman P.K. The aging mouth: differentiating normal aging from disease. *Periodontol*. 2000. 2016; 72(1): 96–107. <https://doi.org/10.1111/prd.12131>
21. Maciejczyk M., Zalewska A., Ładny J.R. Salivary antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to proteins and lipids in healthy children, adults, and the elderly. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 4393460. <https://doi.org/10.1155/2019/4393460>
22. Papale F., Santonocito S., Polizzi A., Giudice A.L., Capodiferro S., Favia G., et al. The new era of salivaomics in dentistry: frontiers and facts in the early diagnosis and prevention of oral diseases and cancer. *Metabolites*. 2022; 12(7): 638. <https://doi.org/10.3390/metabo12070638>
23. Kopenkin M.A., Polushina L.G., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarnyi V.V. Change features of saliva biochemical parameters during aging. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2024; 69(3): 108–15. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-3-108-115> (In Russian)
24. Kopenkin M.A., Polushina L.G., Sementsova E.A., Mandra Y.V., Bazarnyi V.V. Mixed saliva chemical parameters changes in age-related oral diseases. *Uralskii Meditsinskii zhurnal*. 2024; 23(3): 46–58. <https://doi.org/10.52420/umj.23.3.46> (In Russian)
25. Lykova S.G., Svechnikova E.V., Morzhanaeva M.A. Advanced glycation end products as biomarkers of aging. *Vestnik RAEN*. 2018; 18(2): 71–7. (in Russian)
26. Shevtsova A.I., Tkachenko V.A. Advanced glycation end products and their receptors in cardiovascular diseases. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2019; 17(1): 11–6. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2019-17-1-11-16> (In Russian)
27. Jung W.K., Park S.B., Kim H.R., Ryu H.Y., Kim Y.H., Kim J. Advanced glycation end products increase salivary gland hypofunction in d-galactose-induced aging rats and its prevention by physical exercise. *Curr Issues Mol Biol*. 2021; 43(3): 2059–67. <https://doi.org/10.3390/cimb43030142>
28. Akalın F.A., Baltacıoğlu E., Alver A., Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2007; 34(7): 558–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2007.01091.x>
29. Wei D., Zhang X.L., Wang Y.Z., Yang C.X., Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J*. 2010; 55(1): 70–8. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01123.x>

Сведения об авторах:

Копенкин Максим Александрович, аспирант, мл. науч. сотр., ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: maximkopenkin@yandex.ru;

Полушина Лариса Георгиевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: polushina-larisa@bk.ru;

Базарный Владимир Викторович, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, гл. науч. сотр., ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: vlad-bazarny@yandex.ru

Обзоры

© Коллектив авторов, 2025

УДК 616-092.11

Даренская М.А.¹, Гончаров И.С.^{1,2}, Колесников С.И.¹, Семенова Н.В.¹, Колесникова Л.И.¹

Пародонтит и окислительный стресс: современные тенденции в изучении патогенетической взаимосвязи и способы коррекции

¹ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Министерства образования и науки России, 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16;

²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, 664003, Россия, Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 3

В обзоре отражены современные представления о патогенетической роли реакций окислительного стресса и недостаточности факторов антиоксидантной защиты в развитии воспалительных заболеваний пародонта, основанные на анализе результатов экспериментальных и клинических исследований. Патогенез данного рода заболеваний является многофакторным, и, как правило, включает взаимодействие процесса биопленкообразования, предрасполагающих факторов и иммунности организма. Доказана тесная связь пародонтита, как воспалительного процесса, с сердечно-сосудистыми, нейродегенеративными, аутоиммунными, а также онкологическими заболеваниями. В последние годы большое внимание уделяется активным формам кислорода (АФК) в связи с их центральной ролью в прогрессировании многих воспалительных заболеваний, в том числе связанных с тканями пародонта. При пародонтите выделено шесть ключевых генов окислительного стресса (ОС) (CXCR4, SELL, FCGR3B, FCGR2B, PECAM1 и ITGAL), в основном связанных с межклеточной адгезией лейкоцитов, фагоцитозом и клеточной экстравазацией. У пациентов с пародонтитом отмечается повышенное количество определенных фенотипов нейтрофилов с избыточной реактивностью в виде усиленной продукции АФК и провоспалительных медиаторов, что способствует нарушению их хемотаксической способности. Регистрируются как местные, так и системные нарушения редокс-баланса. При пародонтите наблюдается повышенный уровень маркеров ОС в десневой жидкости, тканях десен, слюне, плазме, сыворотке и клетках крови. Также отмечается изменение общего антиоксидантного статуса, активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, миелопероксидазы, уровня витаминов С и Д, каротиноидов, мочевой кислоты, восстановленного глутатиона, мелатонина. Многочисленные свидетельства эффективности антиоксидантной терапии (полифенольных соединений, каротиноидов, флавоноидов, антоцианов, водорастворимых витаминов и т. д.) в отношении пародонтита однозначно установили, что их использование должно быть частью терапевтического подхода в лечении.

Ключевые слова: пародонтит; патогенез; окислительный стресс; воспаление; антиоксидантная терапия

Для цитирования: Даренская М.А., Гончаров И.С., Колесников С.И., Семенова Н.В., Колесникова Л.И. Пародонтит и окислительный стресс: современные тенденции в изучении патогенетической взаимосвязи и способы коррекции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 81–91.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.81-91

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Даренская М.А., Колесникова Л.И.; сбор и обработка материала – Даренская М.А., Гончаров И.С., Семенова Н.В.; написание текста – Даренская М.А., Гончаров И.С.; редактирование – Колесников С.И., Колесникова Л.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Даренская Марина Александровна, e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2025

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Darenskaya M.A.¹, Goncharov I.S.^{1,2}, Kolesnikov S.I.¹, Semenova N.V.¹, Kolesnikova L.I.¹

Periodontitis and oxidative stress: Current trends in the study of pathogenetic relationships and methods of correction

¹Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, 16 Timiryazeva St., Irkutsk, 664003, Russian Federation;²Irkutsk State Medical University, 3 Krasnogo Vosstaniya, Irkutsk, 664003, Russian Federation

The review addresses modern concepts of the pathogenetic role of oxidative stress (OS) and deficiency of antioxidant defense factors in the development of inflammatory periodontal diseases based on experimental and clinical reports. The pathogenesis of this disease is multifactorial and generally involves the interaction of the biofilm formation, predisposing factors, and body immunogenicity. A close relationship has been demonstrated between periodontitis as an inflammatory process with cardiovascular, neurodegenerative, autoimmune, and oncological diseases. In recent years, much attention has been paid to reactive oxygen species (ROS) due to their central role in the progression of many inflammatory diseases, including those related with periodontal tissues. Six key OS genes (CXCR4, SELL, FCGR3B, FCGR2B, PECAM1, and ITGAL) have been identified in periodontitis that are mainly related with leukocyte intercellular adhesion, phagocytosis, and cellular extravasation. Patients with periodontitis have an increased number of certain neutrophil phenotypes with excessive reactivity in the form of increased production of ROS and proinflammatory mediators, which contributes to the impairment of their chemotactic capability. Both local and systemic redox imbalances have been observed. Periodontitis is associated with increased levels of OS markers in the gingival fluid, gingival tissue, saliva, plasma, serum, and blood cells. There are also changes in the total antioxidant status, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase (GPO), myeloperoxidase, vitamins C and D, carotenoids, uric acid, reduced glutathione, and melatonin. Multiple evidence for the effectiveness of antioxidant therapy (polyphenolic compounds, carotenoids, flavonoids, anthocyanins, water- and fat-soluble vitamins, etc.) for periodontitis decisively warrant their use as a part of the therapeutic approach.

Keywords: periodontitis; pathogenesis; oxidative stress; inflammation; relationship; antioxidant therapy**For citation:** Darenskaya M.A., Goncharov I.S., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Kolesnikova L.I. Periodontitis and oxidative stress: Current trends in the study of pathogenetic relationships and methods of correction. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 81–91. (in Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.81-91

Author's contribution: research concept and design – Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I.; material collecting and processing – Darenskaya M.A., Goncharov I.S., Semenova N.V.; writing the text – Darenskaya M.A., Goncharov I.S.; editing the text – Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I.

Approval of the final version of the article – all co-authors.

For correspondence: *Darenskaya Marina Alexandrovna*, e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru**Information about the authors:**Darenskaya M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3255-2013>Kolesnikov S.I., <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>Semenova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6512-1335>Kolesnikova L.I., <https://orcid.org/0000-0003-3354-2992>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 10.01.2025

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) составляют актуальную, до конца нерешенную проблему современного здравоохранения вследствие высокой распространенности у населения различных возрастов, хронического течения и осложнений на фоне нерационального, преимущественно симптоматического лечения [1]. По обобщенным данным экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), интактный пародонт встречается лишь в 2–10% наблюдений,

а ВЗП выявляются у 90–95% взрослого населения [2]. Имеются данные об определенной частоте заболеваний пародонта в молодом возрасте: от 55,0 до 99,0 % в возрастной группе от 15 до 20 лет, от 65,0 до 98,0 % в возрастной группе от 35 до 44 лет [3, 4]. Наиболее часто ВЗП встречаются у лиц мужского пола [5]. Причем отмечается резкий рост числа молодых людей с тяжелыми деструктивными и атрофическими заболеваниями пародонта, являющимися наиболее распространенной причиной выпадения зубов у взрослых людей [4]. К ВЗП относят гингивиты, пародонтиты, пародонто-

зы, идиопатические заболевания с прогрессирующим лизисом тканей, пародонтомы [6].

Патогенез пародонтита

Пародонтиты — это заболевания зубочелюстной системы, характеризующиеся развитием острого или хронического воспалительного процесса, деструкцией тканей пародонта и атрофией костной ткани альвеол [1]. Основной причиной пародонтита считается обширная колонизация полости рта специфическими патогенными бактериями (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Filifactor alocis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и др.), прямо или косвенно способствующими разрушению пародонтальных тканей [7]. Данные бактерии образуют биопленку или зубной налет, который превращается в зубной камень. Патогенез пародонтита является многофакторным, и, как правило, включает взаимодействие процесса биопленкообразования, наличия предрасполагающих факторов и иммуногенности организма [8].

Основными предрасполагающими факторами являются генетическая предрасположенность, курение, плохая гигиена полости рта, наличие заболеваний желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы [9]. Факторы риска, связанные с пародонтитом тяжелой степени у молодых людей, включают также кровоточивость десен, низкую минеральную плотность костной ткани, избыточный вес и курение [8]. В возникновении пародонтита в молодом возрасте существенную роль играют также травмы десневого кармана, особенности строения мягких тканей преддверия, частичная адентия, травматическая окклюзия и т. д. [10]. Наличие системных заболеваний (сахарный диабет, артериальная гипертензия (АГ)), прием лекарственных препаратов, гормональные изменения, безусловно, могут иметь существенное влияние на ткани пародонта. Так, установлено, что коморбидные ассоциации пародонтита, в частности, с АГ в подростковом возрасте сопровождаются нарушениями системной гемодинамики и способствует более активному протеканию воспалительных процессов в пародонтальных тканях [11]. Авторами было отмечено, что при пародонтите у подростков с АГ скоростные характеристики тканевого кровотока в микрососудах пародонта уменьшаются, что свидетельствует о снижении уровня перфузии тканей кровью [12]. Отмечено также, что нарушения в системе иммунитета, локальные изменения кислотно-щелочного равновесия, гипоксия и другие неблагоприятные факторы способствуют размножению патогенных микроорганизмов, увеличению активности

оппортунистической инфекции, прогрессированию воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта [13]. Бактерии, со своей стороны, также способны выделять факторы вирулентности, напрямую разрушающие тканевые структуры и стимулирующие иммунный ответ организма [8]. При этом дисбаланс между провоспалительными цитокинами (IL-1, IL-6 и TNF- α) и противовоспалительными факторами выступает решающим звеном повреждений [14]. В последние годы доказано, что пародонтит, как воспалительный процесс, может быть эпидемиологически связан с другими хроническими воспалительными заболеваниями, к которым относятся сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, аутоиммунные, а также онкологические и др. [15-17].

Активные формы кислорода и окислительный стресс

В последние годы большое внимание уделяется активным формам кислорода (АФК) в связи с их центральной ролью в прогрессировании многих воспалительных заболеваний [18, 19]. АФК, как высокорезакционные молекулы, участвуют в реализации разного рода свободнорадикальных процессов в клетках, в том числе в работе системы иммунитета [20]. Активность клеток, обеспечивающих антимикробный иммунитет, нейтрофилов и макрофагов, продукция провоспалительных цитокинов в целом зависит от АФК [21]. Важной является роль АФК в генерации антивирусного иммунного ответа [20].

В условиях избыточного содержания, АФК могут напрямую повреждать ткани, стимулируя реакции липопероксидации, повреждение ДНК, белков и окисления жизненно-важных ферментов, выступать медиаторами воспаления [22]. Наличие стойкой взаимосвязи АФК и воспаления было доказано во многих исследованиях, причем как сам процесс воспаления является причиной повышенной выработки АФК и истощения системы антиоксидантной защиты (АОЗ), так и АФК способны поддерживать воспаление, что, в свою очередь, способствует прогрессированию заболевания [23, 24]. АФК активируют воспалительные сигнальные механизмы посредством протеинкиназ, транскрипционных факторов, роста геномной экспрессии провоспалительных факторов, что, в свою очередь, способствует гиперактивации иммунной системы [25, 26].

Оптимальный уровень АФК поддерживается системой АОЗ, куда входят антиоксиданты неферментативной (жиро- и водорастворимые витамины, восстановленный глутатион (GSH), церулоплазмин, ферритин, карнозин и др.) и ферментативной (супероксиддисму-

тазы (СОД), каталаза (КАТ), глутатионпероксидазы (ГПО, восемь изоформ), глутатион-S-трансферазы (Г-S-T), глутатионредуктазы (ГР), пероксиредоксины (шесть изоформ), альдокеторедуктазы, гемоксигеназы и т.д.) природы [27]. Состояние, при котором избыточный рост АФК не может быть компенсирован факторами системы АОЗ трактуется как окислительный стресс (ОС) [28, 29]. Баланс генерации свободных радикалов и активность системы АОЗ оцениваются по накоплению различных продуктов окисления биосубстратов клетки – диеновых конъюгатов, малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа, уровню окисленности белков, ДНК, активности различных звеньев системы АОЗ [22].

Взаимосвязь окислительного стресса и пародонтита

Ряд клинических и экспериментальных исследований продемонстрировали тесную взаимосвязь ОС и ВЗП [30, 31]. Нейтрофилы были обнаружены в качестве преобладающих клеток врожденного иммунитета в тканях пародонта и, как правило, первыми привлекаются к месту инфекции [10, 30]. Данные клетки используют различные рецепторы для распознавания, например, такие как толл-подобные рецепторы на поверхности патогена, что позволяет им обнаруживать и связываться с микробными компонентами, инициируя процесс фагоцитоза [10]. Фагоцитоз реализуется за счет выработки НАДФН-оксидазой АФК, включающих супероксид-анион, перекись водорода и гидроксильные радикалы, в ходе «дыхательного взрыва», который позволяет устранить патогенные агенты [30]. Также нейтрофилы могут активироваться через альтернативные пути, посредством высвобождения различных ферментов (миелопероксидазы, эластазы, катепсина), содержащихся в специализированных гранулах (процесс дегрануляции нейтрофилов) [10]. Привлечение нейтрофилов из кровотока в ткани пародонта находится под контролем комплекса хемокинов, цитокинов и молекул адгезии, которые активируются в ответ на микробное воздействие [32]. Выяснено, что пародонтальные патогены, формирующие биопленку, способствуют усиленному привлечению и активации нейтрофилов в тканях пародонта [10, 32]. У пациентов с пародонтитом отмечали повышенное количество определенных фенотипов нейтрофилов с избыточной реактивностью в виде повышенной продукции АФК, TNF- α и эластазы [33, 34]. Причем синтез АФК нейтрофилами может играть двойную роль при пародонтите, как защитную, так и повреждающую [35]. Выяснено, например, что протеазы, синтезированные ней-

трофилами (матриксные металлопротеиназы (ММП), эластаза и катепсины), могут усугублять разрушение внеклеточного матрикса и резорбцию костной ткани [10, 32]. Состояние хронического воспаления при пародонтите может привести к аберрантной активации нейтрофилов и устойчивому высвобождению провоспалительных медиаторов, что, в конечном итоге приводит к повреждению тканей и прогрессированию заболевания [10].

Отмечается, что некоторые пародонтальные бактерии, такие как, например, *Porphyromonas gingivalis*, могут избегать нейтрофильные системы уничтожения, что способствует длительному воспалению [36]. Для выполнения бактерицидной роли нейтрофилы могут образовывать особые структуры – нейтрофильные внеклеточные ловушки, в процессе, называемом нетозом (выброс нейтрофильного ядерного хроматина во внеклеточную среду) [37]. Имеются также данные о том, что некоторые микроорганизмы при пародонтите могут избегать нейтрофильных ловушек через синтез определенных нуклеаз, что позволяет распространиться бактериальной инфильтрации, приводит к более выраженной воспалительной реакции, и, как следствие, к разрушению тканей пародонта [38]. Это свойство было зафиксировано у бактерий, которые традиционно считались патогенами пародонта – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens* и *Streptococcus gordonii* [10].

Считается, что одним из механизмов этиопатогенеза пародонтита являются нарушения местных и/или системных показателей ОС [30, 31]. Известно, что ОС регулируется различными экспрессируемыми генами, связанными с окислительным стрессом (ОС-генами), которые прямо или косвенно отвечают за патогенез заболеваний [27, 28]. В общей сложности при пародонтите было выделено 74 гена, экспрессия которых изменяется при ОС, в том числе 65 генов с повышенной экспрессией и 9 генов с пониженной экспрессией [39]. Шесть из них были определены как ключевые гены ОС (CXCR4, SELL, FCGR3B, FCGR2B, PECAM1 и ITGAL) пародонтита и в основном, связаны с межклеточной адгезией лейкоцитов, фагоцитозом и клеточной экстравазацией [39].

В целом, данные различных авторов показали, что у пациентов с пародонтитом повышен уровень маркеров ОС в различных биосубстратах, в том числе в десневой жидкости, тканях десен, слюне, плазме крови и эритроцитах [40, 41]. Так, большинство исследований продемонстрировали рост значений конечных продуктов липопероксидации. У больных пародон-

титом увеличено количество малонового диальдегида (МДА) в слюне в сравнении со здоровым пародонтом [40]. Причем выявлена тесная взаимосвязь повышенного уровня данного показателя и тяжелой формы пародонтита [42], особенно в группах лиц подросткового и пожилого возраста [43]. Установлено повышение уровня МДА также в десневой жидкости и тканях десны в сравнении со здоровыми и связь их с агрессивностью течения заболевания [40]. У пациентов с хроническим и генерализованным агрессивным пародонтитом уровни интегрального индекса ОС в сыворотке и слюне были значительно выше, чем в контроле [31, 40]. Тесные корреляции наблюдались между параметрами пародонта, МДА и значениями данного индекса [42]. Относительно уровня МДА в сыворотке крови при пародонтите часто демонстрируются противоречивые результаты [43]. Так, имеются данные об отсутствии влияния пародонтита на уровень МДА в системном кровотоке в сочетании с повышением его уровня при локальном измерении [44]. Недавно проведенный метаанализ 24 исследований продемонстрировал стойкое повышение уровня МДА в системном кровотоке у пациентов с пародонтитом [40]. В другом исследовании группа с пародонтитом имела значительно более высокие уровни МДА в слюне и плазме, при этом пародонтальная терапия не приводила к существенным изменениям показателя [44].

Помимо роста значений МДА, у пациентов с пародонтитом отмечается также увеличение уровня 8-ОНдГ [45], 4-гидроксиноненаля [41] карбонилированных белков [31], оксида азота (NO) и продуктов окисления белков и липидов, 8-изопростанов [43]. Отмечалось, что уровень 8-изопростанов возрастал в десневой жидкости при пародонтите и тесно коррелировал с индексом гингивита, глубиной пародонтального кармана [46]. Продукты окислительного повреждения белков также считаются чувствительным биомаркером, особенно прочно связанным с активацией нейтрофилов и активностью миелопероксидазы и тесно коррелирующим с маркерами состояния пародонта [31]. Интересным представляется также, что уровень 8-ОНдГ, надежного маркера повреждения ДНК связан с наличием и/или количеством таких бактерий, как *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и *Streptococcus anginosus* при пародонтите [45, 47].

Ряд исследований последних лет касались изучения интенсивности нитрозативного стресса в слюне больных с пародонтитом [48]. В основном обнаруживался повышенный уровень данных биомаркеров, коррелирующий с риском развития коморбидности патологии

пародонта и сердечно-сосудистых заболеваний [30, 48]. При этом у мужчин с пародонтитом наблюдались более низкие уровни NO в слюне по сравнению с женщинами [30]. Проведенный биоинформационный анализ показал наличие взаимосвязи между пародонтитом и процессом ферроптоза, указывая на значительную связь между генами, связанными с ферроптозом, и пародонтитом, что имеет большое значение для диагностики пародонтита [49]. Выяснено, что у пациентов с пародонтитом повышаются и менее распространенные маркеры окислительного повреждения клеток, такие как маркеры ядерных аномалий, укорочение длины теломер лейкоцитов [50, 51]. Пародонтит может вносить вклад в повышение уровня конечных метаболитов ОС в системном кровотоке у пациентов с сахарным диабетом, сердечно-сосудистыми расстройствами, ревматоидным артритом, неалкогольной жировой болезнью печени и т. д. [52]. В свою очередь, это может приводить к усилению повреждения тканей, включая ткани десны, усугубляя патологический процесс.

Фактор курения может выступать одним из важнейших факторов риска развития пародонтита, и, кроме того, значительно повышать уровень системного и локального ОС независимо от влияния пародонтита [53]. Обнаружено, что у подростков с заболеваниями пародонта и артериальной гипертензией нарастает дисбаланс в системе липопероксидации с накоплением конечных ТБК-активных продуктов, снижением активности факторов АОЗ, а также появлением патологических зависимостей между параметрами липопероксидации и показателями, характеризующими снижение сосудистого кровотока [12, 54].

Система антиоксидантной защиты при пародонтите

Исследования системы АОЗ при пародонтите в основном касаются активности ГР, СОД, КАТ, ГПО, миелопероксидазы, уровня витамина С, мочевой кислоты, GSH, мелатонина и интегрального показателя – общего антиоксидантного статуса [31, 40, 42]. Результаты данных исследований, хотя и носят противоречивый характер, однозначно указывают на то, что антиоксидантный статус, и, следовательно, окислительно-восстановительный баланс при пародонтите часто нарушается именно в слюне [30, 31, 42]. Так, у пациентов с пародонтитом отмечалась более низкая активность СОД, КАТ и ГР в образцах слюны, что отрицательно коррелировало с такими клиническими параметрами, как глубина пародонтального кармана, клиническая потеря прикрепления, гигиенический индекс и индекс зубного налета [31]. У пациентов с хро-

ническим и агрессивным пародонитом активность СОД и глутатиона в слюне была повышена, тогда как ГПО и ГР снижены [55].

ОАС (общий антиоксидантный статус) слюны у пациентов с агрессивными формами пародонтита был ниже, чем у пациентов с хроническим пародонитом, при этом у пациентов с хроническим пародонитом антиоксидантная способность была ниже, чем в контрольной группе [56]. Метаанализ 39 исследований по оценке показателя ОАС в плазме, сыворотке, десневой жидкости и слюне, в которых приняли участие 1418 пациентов в основной группе и 1340 пациентов в контрольной группе, показал значительное снижение ОАС у пациентов с пародонитом по сравнению с клинически здоровым пародонтом [40]. Установлена связь между пародонитом и повышенным уровнем мочевой кислоты в плазме крови, пониженным ее содержанием в слюне [57]. У пациентов с пародонитом отмечались нарушения гомеостаза глутатиона в нейтрофилах периферической крови, что существенно нарушало хемотаксическую способность этих клеток в борьбе с инфекционными агентами [58]. Концентрация мелатонина в жидкости десневой борозды была значительно ниже у пациентов с пародонитом, в особенности курящих, в сравнении с контролем [59].

Недавние исследования связали наличие активности пероксидаз (сиалопероксидазы и миелопероксидазы) с грамположительной кокковой микробной флорой, а недостаточность последней при дисбиозе связывают с пародонитом [60].

Поскольку витамин С является важным элементом процесса стабилизации коллагена в тканях, его дефицит может привести к нестабильности этого белка, соответствующему ослаблению пародонтальных связей и, как следствие, потерям зубов [61]. У пациентов с пародонитом IV стадии уровень витамина С был значительно ниже, чем у пациентов на ранних стадиях, а более высокие его концентрации в сыворотке ассоциировались с уменьшением отношения шансов для тяжелого пародонтита [62]. Отмечалось, что дефицит витамина Д приводил к снижению плотности костной ткани, остеопорозу и, как следствие, прогрессированию заболеваний пародонта; с другой стороны, достаточный уровень этого витамина помогал снизить риск осложнений, обладал иммуномодулирующим, противовоспалительным и антипролиферативным эффектом [63]. Показано, что средние уровни предшественников витамина А — цис- β -каротина и β -криптоксантина, а также фолата, витамина В12, Д и Е были ниже в группе с пародонитом, чем у здоровых добровольцев, хотя разница была статистически значимой только

в случае β -криптоксантина, витамина В12 и витамина Д [64]. Показаны более низкие уровни каротиноидов — β -каротина, β -криптоксантина в крови у пациентов с умеренным/тяжелым пародонитом [65]. Уровень лактоферрина, миелопероксидазы и IL-1 β коррелировали с клиническими маркерами повреждения пародонта [60].

Возможности антиоксидантной терапии пародонтита

Безусловно, лечение пародонтита необходимо и приводит не только к существенному улучшению состояния пародонта, но и системных показателей, включая снижение кардиометаболических рисков [13]. Терапевтические подходы в большинстве случаев ограничены общей воспалительной реакцией и характеризуются использованием традиционных методов в сочетании с растительными антиоксидантными соединениями [46].

За последнее десятилетие значительно возрос интерес к натуротерапии, которая подразумевает использование продуктов натурального происхождения в качестве жизнеспособной и безопасной альтернативы антибиотикам и синтетическим продуктам [66]. В лечении пародонтита чаще всего используют натуральное сырье в виде гелей, капель, ополаскивателей, настоек, настоев, зубных паст [46, 61, 66].

Среди активных соединений, противодействующих ОС при пародоните, к настоящему времени выделены эфирные масла, монотерпеноиды, фенольные соединения, камеди, смолы, дубильные вещества, флавоноиды, антоцианы, каротиноиды, хлорофилл, витамины и биоэлементы (особенно цинк) [66]. Эфирные масла можно найти во всех органах масличных растений (листьях, цветах, плодах, корневищах и коре). К ним относятся масло корицы и гвоздики, коричный альдегид и эвгенол. Отмечают высокую эффективность шалфея, мяты перечной, ромашки обыкновенной, коры дуба, тимьяна, эвкалипта, Melissa, китайской корицы, лимонного экстракта, девясила, продукты пчеловодства (в особенности прополис и мед), чеснока, куркумы и т. д. [67]. Природные соединения помимо всего действуют на инфекции полости рта, подавляя рост бактерий (бактериостатический эффект), уменьшая количество бактерий (бактерицидный эффект), предотвращая микробную адгезию, подавляя выработку водорастворимых глюканов, ингибируя амилазы и разрушая биопленку [65].

Вследствие системного влияния заболевания на организм, актуальными являются обязательные рекомендации по диете, питанию и приему соединений

с антиоксидантными свойствами. Исследования, проведенные в последнее время показали, что фенольные соединения, содержащиеся в продуктах питания, помимо выраженного антимикробного и антиагрегантного действия обладают также антиоксидантным эффектом, а диета, богатая полифенолами, может помочь предотвратить изменения в бактериальной флоре полости рта [67]. Широким спектром действия обладают также – мед/прополис, зеленый чай, алоэ вера, клюква, кофе, какао, виноград, оливковое масло, солодка [66]. Общеизвестно, что витамины оказывают значительное влияние на здоровье полости рта, в том числе пародонта [68]. Отмечено, что показатели пародонтита (кровоточивость десны, общая площадь воспаленной поверхности пародонта) снижались вдвое при диете, богатой витамином Д в комплексе с витамином С, ненасыщенными жирными кислотами омега-3 и антиоксидантами [69]. Результаты большого числа исследований показали, что витамин С проявляет противовоспалительную активность в отношении пародонта, ингибируя реакции ОС и синтез провоспалительных факторов, сдерживает развитие бактериальной инфекции, стимулирует фагоцитарную способность нейтрофилов, синтез коллагена и прочность сосудов, что приводит к лучшей регенерации тканей [70]. Регистрировали снижение кровоточивости десен вследствие использования витамина С в течение 1-2 мес у пациентов, страдающих хроническим пародонтитом [71]. Применение фиксированной дозы комбинации витамина С, витамина Е, лизоцима (антимикробный эффект) и карбазохрома (кровоостанавливающее средство) значительно снижало воспаление десен [72]. Витамин Е состоит из двух основных групп – токоферолов и токотриенолов, которые являются липофильными соединениями с превосходными противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. Было показано, что витамин Е может улучшить состояние пародонта, регулируя окислительно-восстановительный дисбаланс, уменьшая воспаление и способствуя заживлению ран [73]. Добавка комплекса витаминов В привела к значительному снижению клинических показателей пародонтита (индекс зубного налета, индекс десневой кровоточивости, глубина зондируемого кармана и относительный уровень прикрепления), улучшению микробного профиля и снижению воспалительных медиаторов по сравнению с плацебо [74]. В целом, результаты последнего крупного метаанализа с общим числом участников исследования 74488 продемонстрировали отрицательную связь между потреблением высоких доз витаминов А, комплекса витаминов В, витамина С, витами-

на Д и витамина Е и вероятностью развития заболеваний пародонта, что свидетельствует о значительной роли витаминов в профилактике заболеваний пародонта [75]. Сообщалось, что диетическое потребление β-каротина связано с уменьшением глубины пародонтального кармана после лечения пародонта у некурящих, но не у курильщиков с хроническим пародонтитом [65]. β-криптоксантин значительно снижал индуцированную прогестероном продукцию IL-6 и IL-8 в клетках периодонтальной связки, что подтверждает эффективность данного каротиноида для лечения пародонтита [65, 75]. Поскольку пародонтит вызывает потерю альвеолярной кости, астаксантин и транс-ретиноевая кислота могут быть полезны для пациентов с пародонтитом с постменопаузальным остеопорозом [65]. В ряде исследований отмечено, что коэнзим Q10 способен предотвращать хронический пародонтит [76].

Сигнальный путь ядерного фактора эритроидного 2-родственного фактора 2 (NFE2L2 или NRF2)/Kelch-подобного ECH-ассоциированного белка 1 (KEAP1) (NRF2/KEAP1) играет ключевую роль в пародонтите, модулируя окислительно-восстановительный баланс и воспаление пародонта [77]. Целый ряд природных соединений (кверцетин, биоханин А, 10-оксо-транс-11-октадеценвая кислота, фенолэфир кофейной кислоты, пинол, ресвератрол, куркумин и т.д.) продемонстрировали высокую эффективность в отношении сигнальных путей ОС и могут использоваться в качестве добавок в комплексной терапии пародонтита [77]. Сульфорафан, натуральный продукт, обнаруженный в овощах семейства крестоцветных, значительно увеличивал внутриклеточное соотношение GSH/окисленный глутатион и нейтрофильный респираторный взрыв в первичных нейтрофилах у пациентов с пародонтитом [78].

Современные методы коррекции ОС при пародонтите включают также применение наноматериалов, поглощающих АФК и инфракрасной лазерной терапии, предлагая многообещающий доклинический эффект в лечении пародонтита [46]. В связи с доказанным участием реактивности нейтрофилов в патогенезе пародонтита, перспективными становятся такие стратегии, как ингибирование специфических сигнальных путей этих клеток, модуляция активации нейтрофилов, стимулирование механизмов бактериального очищения, что может предотвратить постоянное высвобождение воспалительных медиаторов, восстановить баланс между иммунным ответом хозяина и гомеостазом тканей [10].

Таким образом, несмотря на многолетние исследования роли реакций ОС в патогенезе пародонтита,

работы в этом направлении актуальны и в настоящее время. Появляются все новые доказательства причинно-следственной связи метаболитов ОС и пародонтита, активно продолжаются клинические исследования применения антиоксидантов и природных соединений в отношении основных проявлений заболевания. продемонстрированы возможности исследования показателей ОС в физиологических жидкостях организма, в частности, в слюне, для диагностики и мониторинга течения пародонтита. Однозначно установлено, что использование препаратов с антиоксидантными свойствами должно быть частью терапевтического подхода в лечении воспалительных заболеваний пародонта.

Литература

(п.п. 1–11; 13–19; 23; 25–78 см. References)

12. Колесникова Л.Р., Даренская М.А., Погодина А.В., Гребенкина Л.А., Натяганова Л.В., Колесникова Л.И. и др. Взаимосвязь показателей гемодинамики микрососудистого русла пародонта и продуктов липопероксидации у подростков с артериальной гипертензией. *Стоматология*. 2020; 99(4): 9-14. <https://doi.org/10.17116/stomat2020990419>
20. Даренская М.А., Колесникова Л.И., Колесников С.И. Свободнорадикальные реакции при социально значимых инфекционных заболеваниях: ВИЧ-инфекции, гепатитах, туберкулезе. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020; 75(3): 196-203. <https://doi.org/10.15690/vramn1328>
21. Пинегин Б.В., Воробьева Н.В., Пашенков М.В., Черняк Б.В. Роль митохондриальных активных форм кислорода в активации врожденного иммунитета. *Иммунология*. 2018; 39(4): 221-9. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-4-221-229>
22. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16(4): 16-29. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-16-29>
24. Колесникова Л.И., Колесников С.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Тимофеева Е.В., Лещенко О.Я. и др. Оценка про- и антиоксидантного статуса у женщин с ВИЧ и коинфекцией. *Терапевтический архив*. 2016; 88(11): 17-21. <https://doi.org/10.17116/terarkh2016881117-21>
5. Lipsky M.S., Su S., Crespo C.J., Hung M. Men and oral health: a review of sex and gender differences. *American journal of men's health*. 2021; 15(3): 15579883211016361. <https://doi.org/10.1177/15579883211016361>
6. Martínez-García M., Hernández-Lemus E. Periodontal inflammation and systemic diseases: an overview. *Frontiers in physiology*. 2021; 12: 709438. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.709438>
7. Ji S., Kook J.K., Park S.N., Lim Y.K., Choi G.H., Jung, J.S. Characteristics of the salivary microbiota in periodontal diseases and potential roles of individual bacterial species to predict the severity of periodontal disease. *Microbiology Spectrum*. 2023; 11(3): e04327-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04327-22>
8. Hung M., Kelly R., Mohajeri A., Reese L., Badawi S., Frost C., et al. Factors associated with periodontitis in younger individuals: A scoping review. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(20): 6442. <https://doi.org/10.3390/jcm12206442>
9. Ray R.R. Periodontitis: an oral disease with severe consequences. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2023; 195(1): 17-32. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04127-9>
10. Bassani B., Cucchiara M., Butera A., Kayali O., Chiesa A., Palano M.T., et al. Neutrophils' contribution to periodontitis and periodontitis-associated cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(20): 15370. <https://doi.org/10.3390/ijms242015370>
11. Darenskaya M.A., Kolesnikova L.R., Rychkova L.V., Grebenkina L.A., Semenova N.V., Druzhinina E.B., et al. Comparative analysis of lipid peroxidation system in humans and rats with arterial hypertension. *International Journal of Biomedicine*. 2019; 9(4): 292-96. [https://doi.org/10.21103/Article9\(4\) OA3](https://doi.org/10.21103/Article9(4) OA3)
12. Kolesnikova L.R., Darenskaya M.A., Pogodina A.V., Grebenkina L.A., Natyaganova L.V., Kolesnikova L.I., et al. The relationship of hemodynamic parameters of periodontal microvascular bed and lipid peroxidation products in adolescents with arterial hypertension. *Stomatologiya*. 2020; 99(4): 9–14. <https://doi.org/10.17116/stomat2020990419> (In Russian)
13. Orlandi M., Munoz Aguilera E., Marletta D., Petrie A., Suvan J., D' Aiuto F. Impact of the treatment of periodontitis on systemic health and quality of life: A systematic review. *Journal of clinical periodontology*. 2022; 49: 314-27. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13554>
14. Salvi G.E., Rocuzzo A., Imber J.C., Stähli A., Klinge B., Lang N.P. Clinical periodontal diagnosis. *Periodontology 2000*. 2023; 00: 1–19. <https://doi.org/10.1111/prd.12487>
15. Schenkein H.A., Papapanou P.N., Genco R., Sanz M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontology 2000*. 2020; 83: 90-106. <https://doi.org/10.1111/prd.12304>
16. Genco R.J., Sanz M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontology 2000*. 2020; 83: 7-13. <https://doi.org/10.1111/prd.12344>
17. Ishai A., Osborne M.T., El Kholy K., Takx R.A.P., Ali A., Yuan N., et al. Periodontal disease associates with arterial inflammation via potentiation of a hematopoietic-arterial axis. *JACC Cardiovasc. Imaging*. 2019; 12: 2271–3. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.05.015>
18. Kolesnikova L.I., Kolesnikova L.R., Darenskaya M.A., Natyaganova L.V., Grebenkina L.A., Korytov L.I., et al. Comparison of reactivity

- of the lipid peroxidation–antioxidant defense system in normal and hypertensive rats at different stages of stress-reaction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 166(5): 613–6. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04403-5>
19. Darenskaya M., Kolesnikova L., Kolesnikov S. The association of respiratory viruses with oxidative stress and antioxidants. implications for the COVID-19 pandemic *Current Pharmaceutical Design*. 2021; 27(13): 1618–27. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210222113351>
 20. Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. Free radical reactions in socially significant infectious diseases: HIV infection, hepatitis, tuberculosis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2020; 75(3): 196–203. <https://doi.org/10.15690/vramn1328> (In Russian).
 21. Pinegin B.V, Vorob'yova N.V., Pashchenkov M.V., Chernyak B.V. The role of mitochondrial reactive oxygen species in the activation of innate immunity. *Immunologiya*. 2018; 39(4): 221–9. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-4-221-229> (In Russian)
 22. Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiologist's view. *Byulleten' Sibirskoi Meditsiny*. 2017; 16(4): 16–29. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-16-29> (In Russian)
 23. McGarry T., Biniecka M., Veale D.J., Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 125: 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042>
 24. Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Timofeeva E.V., Leshchenko O.Ya., et al. Evaluation of pro- and antioxidant status in women with HIV and coinfection. *Terapevticheskiy arhiv*. 2016; 88(11): 17–21. <https://doi.org/10.17116/terarkh2016881117-21> (In Russian)
 25. Choudhury G., MacNee W. Role of inflammation and oxidative stress in the pathology of ageing in COPD: potential therapeutic interventions. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2017; 14(1): 122–35. <https://doi.org/10.1080/15412555.2016.1214948>
 26. Bairova T.A., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I., Pervushina O.A., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A. Lipid peroxidation and mitochondrial superoxide dismutase-2 gene in adolescents with essential hypertension. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158(2): 181–4. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2717-4>
 27. Halliwell B. Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024; 25(1): 13–33. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00645-4>
 28. Sies H., Mailloux R.J., Jakob U. Fundamentals of redox regulation in biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024; 25: 701–19. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00730-2>
 29. Kolesnikova L.I., Rychkova L.V., Kolesnikova L.R., Darenskaya M.A., Natyaganova L.V., Grebenkina L.A., et al. Coupling of lipoperoxidation reactions with changes in arterial blood pressure in hypertensive isiah rats under conditions of chronic stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 164(6): 712–5. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4064-3>
 30. Patil R.T., Dhadse P.V., Salian S.S., Punse S.D., Dhadse P. Role of Oxidative Stress in Periodontal Diseases. *Cureus*. 2024; 16(5): e60779. <https://doi.org/10.7759/cureus.60779>
 31. Palomino-Segura M., Sicilia J., Ballesteros I., Hidalgo A. Strategies of neutrophil diversification. *Nature immunology*. 2023; 24(4): 575–84. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01452-x>
 32. Baltacıoğlu E., Yuva P., Aydın G., Alver A., Kahraman C., Karabulut E., et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *Journal of periodontology*. 2014; 85(10): 1432–41. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130654>
 33. Ng L.G., Ostuni R., Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nature reviews. Immunology*. 2019; 19(4): 255–65. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0141-8>
 34. Sansores-Espana L.D., Melgar-Rodriguez S., Vernal R., Carrillo-Avila B.A., Martinez-Aguilar V.M., Diaz-Zuniga J. Neutrophil N1 and N2 subsets and their possible association with periodontitis: a scoping review. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23(20): 12068. <https://doi.org/10.3390/ijms232012068>
 35. Tsioumpkou M., Krijgsman D., Leusen J.H., Olofsen P.A. The role of cytokines in neutrophil development, tissue homing, function and plasticity in health and disease. *Cells*. 2023; 12(15): 1981. <https://doi.org/10.3390/cells12151981>
 36. Demkovych A., Kalashnikov D., Hasiuk P., Zubchenko S., Vorobets A. The influence of microbiota on the development and course of inflammatory diseases of periodontal tissues. *Frontiers in oral health*. 2023; 4: 1237448. <https://doi.org/10.3389/froh.2023.1237448>
 37. Hajishengallis G. New developments in neutrophil biology and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2020; 82(1): 78–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12313>
 38. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Moscow)*. 2020; 85(10): 1178–90. <https://doi.org/10.1134/S0006297920100065>
 39. Zhang Z., Zheng Y., Bian X., Wang M., Chou J., Liu H., et al. Identification of key genes and pathways associated with oxidative stress in periodontitis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022; 2022(1): 9728172. <https://doi.org/10.1155/2022/9728172>
 40. Mohideen K., Chandrasekaran K., Veeraraghavan H., Faizee S.H., Dhungel S., Ghosh S. Meta-analysis of assessment of total oxidative stress and total antioxidant capacity in patients with periodontitis. *Disease Markers*. 2023; 2023(1): 9949047. <https://doi.org/10.1155/2023/9949047>
 41. Baima G., Corana M., Iaderosa G., Romano F., Citterio F., Meoni G., et al. Metabolomics of gingival crevicular fluid to identify biomarkers for periodontitis: a systematic review with meta-analysis. *Journal of Periodontal research*. 2021; 56(4): 633–45. <https://doi.org/10.1111/jre.12872>
 42. Skutnik-Radziszewska A., Zalewska A. Salivary redox biomarkers in the course of caries and periodontal disease. *Applied Sciences*. 2020; 10(18): 6240. <https://doi.org/10.3390/app10186240>
 43. Maciejczyk M., Zalewska A., Ładny J.R. Salivary antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to proteins and lipids in healthy children, adults, and the elderly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019(1): 4393460. <https://doi.org/10.1155/2019/4393460>
 44. Veljovic T., Djuric M., Mirnic J., Gusic I., Maletin A., Ramic B., et al. Lipid peroxidation levels in saliva and plasma of patients suffering from periodontitis. *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11(13): 3617. <https://doi.org/10.3390/jcm11133617>
 45. Goriuc A., Cojocar K.A., Luchian I., Ursu R.G., Butnaru O., Foia L. Using 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a reliable biomarker for assessing periodontal disease associated with diabetes.

- International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(3): 1425. <https://doi.org/10.3390/ijms25031425>
46. Pouliau C., Piperi C. Advances of oxidative stress impact in periodontitis: biomarkers and effective targeting options. *Current Medicinal Chemistry*. 2024; 31(38): 6187-203. <https://doi.org/10.2174/0109298673297545240507091410>
 47. Lima L., Gaspar S., Rocha B.S., Alves R., Almeida M.G. Current clinical framework on nitric oxide role in periodontal disease and blood pressure. *Clinical Oral Investigations*. 2024; 28(10): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05913-x>
 48. Toczewska J., Konopka T., Zalewska A., Maciejczyk M. Nitrosative stress biomarkers in the non-stimulated and stimulated saliva, as well as gingival crevicular fluid of patients with periodontitis: review and clinical study. *Antioxidants*. 2020; 9(3): 259. <https://doi.org/10.3390/antiox9030259>
 49. Zhang, S., Jin H., Da J., Zhang K., Liu L., Guo Y., et al. Role of ferroptosis-related genes in periodontitis based on integrated bioinformatics analysis. *PLoS one*. 2022; 17(7): e0271202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271202>
 50. de Mello Lobão W.J., Zajdenverg L., Lopes G.C., de Barros M.C.M., Sansone C., Silva-Boghossian C.M. Redox biomarkers in saliva and nuclear abnormalities in jugal epithelial cells of individuals with type 2 diabetes mellitus and periodontitis. *Archives of Oral Biology*. 2024; 161: 105915. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2024.105915>
 51. Sonoki K., Muraoka K., Morishita M., Awano S., Nakashima K. Periodontal disease shortens the telomere length in human gingival crevicular epithelium cells and human umbilical endothelial cells. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*. 2024; 5(9): 1168-75. <https://doi.org/10.37871/jbres2005>
 52. Szczepanik F.S.C., Grossi M.L., Casati M., Goldberg M., Glogauer M., Fine N., et al. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontology 2000*. 2020; 84(1): 45-68. <https://doi.org/10.1111/prd.12342>
 53. Atagün Ö.S., Baltacıoğlu E., Alver A., Yücesan F.B., Yuva P., Kehribar M.A., et al. Effects of smoking on local and systemic oxidative stress markers in individuals with periodontitis. *Northwestern Medical Journal*. 2024; 4(4): 195-205. <https://doi.org/10.54307/2024.NWMJ.71>
 54. Kolesnikova L.R., Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Grebenkina L.A., Kolesnikov S.I., Korytov L.I., et al. Morphofunctional state of the periodontal tissues in humans and rats with arterial hypertension. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 169(6): 831-5. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04990-8>
 55. Kluknavská J., Krajčiková K., Bolerázská B., Mašlanková J., Ohlasová J., Timková, S., et al. Possible prognostic biomarkers of periodontitis in saliva. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2021; 25(8): 3154-61. https://doi.org/10.26355/eurrev_202104_25724
 56. Toczewska J., Zalewska A., Konopka T., Maciejczyk M. Enzymatic antioxidants activity in gingival crevicular fluid and saliva in advanced periodontitis. *Oral diseases*. 2023; 29(8): 3559-70. <https://doi.org/10.1111/odi.14287>
 57. Ye L.W., Zhao L., Mei Z.S., Zhou Y.H., Yu T. Association between periodontitis and uric acid levels in blood and oral fluids: a systematic review and meta-analysis. *BMC oral health*. 2023; 23(1): 178. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02900-8>
 58. Binti Badlishah Sham N.I., Grant M.M. Role of glutathione in neutrophil chemotaxis in periodontitis. *Oral*. 2023; 3(4): 526-38. <https://doi.org/10.3390/oral3040043>
 59. Balaji T.M., Rao S.R. Salivary, Plasma, and gingival levels of melatonin and TNF- α in nonsmokers and current smokers with and without periodontal disease. *The journal of contemporary dental practice*. 2020; 21(8): 897-904.
 60. Courtois P. Oral peroxidases: From antimicrobial agents to ecological actors. *Molecular Medicine Reports*. 2021; 24(1): 1-12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12139>
 61. Ustianowski Ł., Ustianowska K., Gurazda K., Rusiński M., Ostrowski P., Pawlik A. The role of vitamin C and vitamin D in the pathogenesis and therapy of periodontitis—narrative review. *International journal of molecular sciences*. 2023; 24(7): 6774. <https://doi.org/10.3390/ijms24076774>
 62. Munday M.R., Rodricks R., Fitzpatrick M., Flood V.M., Gunton J.E. A pilot study examining vitamin C levels in periodontal patients. *Nutrients*. 2020; 12(8): 2255. <https://doi.org/10.3390/nu12082255>
 63. Nascimento G.G., Leite F.R., Gonzalez-Chica D.A., Peres K.G., Peres M.A. Dietary vitamin D and calcium and periodontitis: A population-based study. *Frontiers in nutrition*. 2022; 9: 1016763. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1016763>
 64. Hans M., Malik P.K., Hans V.M., Chug A., Kumar M. Serum levels of various vitamins in periodontal health and disease—a cross sectional study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2023; 13(4): 471-5. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2023.05.009>
 65. Naruishi K. Carotenoids and periodontal infection. *Nutrients*. 2020; 12(1): 269. <https://doi.org/10.3390/nu12010269>
 66. Pytko-Polończyk J., Stawarz-Janeczek M., Kryczyk-Poprawa A., Muszyńska B. Antioxidant-rich natural raw materials in the prevention and treatment of selected oral cavity and periodontal diseases. *Antioxidants*. 2021; 10(11): 1848. <https://doi.org/10.3390/antiox10111848>
 67. Jayusman P.A., Nasruddin N.S., Mahamad Apandi N.I., Ibrahim N., Budin S.B. Therapeutic potential of polyphenol and nanoparticles mediated delivery in periodontal inflammation: A review of current trends and future perspectives. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 13: 847-702. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022/847702>
 68. Cagetti M.G., Wolf T.G., Tennert C., Camoni N., Lingström P., Campus G. The role of vitamins in oral health. A systematic review and meta-analysis. *International journal of environmental research and public health*. 2020; 17(3): 938. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030938>
 69. Woelber J.P., Bremer, K., Vach K., König D., Hellwig E., Ratka-Krüger P., et al. An oral health optimized diet can reduce gingival and periodontal inflammation in humans – A randomized controlled pilot study. *BMC Oral Health*. 2016; 17: 28. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0257-1>
 70. Buzatu R., Luca M.M., Bumbu B.A. Does vitamin C supplementation provide a protective effect in periodontal health? a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(16): 859. <https://doi.org/10.3390/ijms25168598>
 71. Li W., Song J., Chen Z. The association between dietary vitamin C intake and periodontitis: result from the NHANES (2009–2014). *BMC Oral Health*. 2022; 22(1): 390. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02416-7>
 72. Hong J.Y., Lee J.S., Choi S.H., Shin H.S., Park J.C., Shin S.I., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study for evaluating the effects of fixed-dose combinations of vitamin C, vitamin E, lysozyme, and carbazochrome on gingival inflammation in chronic periodontitis patients. *BMC Oral Health*, 2019; 19: 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0728-2>

73. Shadisvaaran S., Chin K.Y., Shahida M.S., Ima-Nirwana S., Leong X.F. Effect of vitamin E on periodontitis: evidence and proposed mechanisms of action. *Journal of Oral Biosciences*. 2021; 63(2): 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.04.001>
74. Kalsi R., Bhushan K.S., Mathur M.K., Gupta V., Gupta D.K., Pandey S.K. To evaluate the effect of vitamin B complex on Wound Healing—A Clinical and microbiological study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2024; 16(Suppl 1): S549-S551. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_856_23
75. Mi N., Zhang M., Ying Z., Lin X., Jin Y. Vitamin intake and periodontal disease: a meta-analysis of observational studies. *BMC Oral Health*. 2024; 24(1): 117. <https://doi.org/10.1186/s12903-024-03850-5>
76. Pandav G., Pandav S., Jain S., Saxena D., Aggarwal R., Gulati P. Evaluation of the efficacy of Coenzyme Q10 in the management of chronic periodontitis: a clinical study. *Dent. J. Adv. Stud.* 2021, 10. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1736267>
77. Tossetta G., Fantone S., Togni L., Santarelli A., Olivieri F., Marziani D., et al. Modulation of NRF2/KEAP1 signaling by phytotherapeutics in periodontitis. *Antioxidants*. 2024; 13(10): 1270. <https://doi.org/10.3390/antiox13101270>
78. Mineo S., Takahashi N., Yamada-Hara M., Tsuzuno T., Aoki-Nonaka Y., Tabeta K. Rice bran-derived protein fractions enhance sulfuraphane-induced anti-oxidative activity in gingival epithelial cells. *Arch. Oral Biol.* 2021; 129: 105215. <https://doi.org/10.1016/j.archoral-bio.2021.105215>

Сведения об авторах:

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

Гончаров Иван Сергеевич, соискатель ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, ассистент каф. ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО ИГМУ, e-mail: ivanstom@yandex.ru;

Колесников Сергей Иванович, академик РАН, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, заслуженный деятель науки РФ;

Семенова Наталья Викторовна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. патофизиологии ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, e-mail: natkor_84@mail.ru;

Колесникова Любовь Ильинична, академик РАН, доктор мед. наук, проф., науч. рук. ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, заслуженный деятель науки РФ.

© Будаева М.В., Мелерзанов А.В., 2025

УДК 616.43

Будаева М.В., Мелерзанов А.В.**Роль сахарозаменителей в диабетическом питании и персонализированном управлении заболеванием: Молекулярные и генетические механизмы**

ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141701, Московская обл., Долгопрудный, Россия, Институтский пер., д. 9

В статье рассматривается персонализированный подход к замене сахарозы в питании пациентов с диабетом и предиабетом с учетом молекулярных и генетических механизмов, связанных с индивидуальной вариабельностью результата лечения и прогрессирования заболевания. В обзоре исследованы данные о том, как стратегии персонализированной медицины могут оптимизировать терапевтические результаты и улучшить уход за пациентами. Анализируя сахарозаменители, в частности новые композиции, такие как смесь аминокислот и полиолов, в контексте потенциального применения в профилактике сахарного диабета, в данной статье перечислены механизмы их действия на молекулярном уровне. Также рассмотрен вопрос, как генетические вариации отдельного пациента могут влиять на эффективность и безопасность употребления определенных сахарозаменителей. Описывая потенциал персонализированных подходов, основанных на молекулярных и генетических данных, мы показали возможность эффективного и индивидуализированного управления профилактикой и лечением диабета и других сопутствующих заболеваний, таких как возраст-ассоциированные заболевания, процессы старения, обусловленные гликированием RAGE-рецепторов.

Ключевые слова: сахарный диабет; персонализированная медицина; сахарозаменители**Для цитирования:** Будаева М.В., Мелерзанов А.В. Роль сахарозаменителей в диабетическом питании и персонализированном управлении заболеванием: Молекулярные и генетические механизмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 92-101.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.92-101

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста – Будаева М.В.; редактирование – Мелерзанов А.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех ее частей – все соавторы.**Для корреспонденции:** Будаева Мария Вячеславовна, e-mail: budaeva.mv@phystech.edu**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.12.2024

Принята в печать 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Budaeva M.V., Melerzanov A.V.**The role of sugar substitutes in the nutrition and personalized management of patients with type 2 diabetes mellitus or prediabetic conditions: Molecular and genetic mechanisms**

Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 9 Institutsky Pereulok, Dolgoprudny, 141701, Moscow Region, Russian Federation

This article reviews a personalized approach to sucrose replacement in the nutrition of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) or its risk factors considering molecular and genetic mechanisms associated with individual variabilities in the treatment effect and disease progression. The authors showed the role of personalized therapeutic strategies in optimizing the treatment and patient care. The review of sugar substitutes, including the novel ones, such as a mixture of amino acids and polyols, addressed their molecular mechanisms of action to justify their potential use in the prevention of T2DM. Also, the article described how individual genetic variations may influence the efficacy and safety of specific sugar substitutes. Revealing the potential of personalized approaches based on molecular and genetic data can help more effective and individualized prevention and treatment of T2DM and other comorbidities, such as age-related processes mediated by the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE).

Keywords: diabetes mellitus; personalised medicine; sugar substitutes**For citation:** Budaeva M.V., Melerzanov A.V. The role of sugar substitutes in the nutrition and personalized management of patients with type 2 diabetes mellitus or prediabetic conditions: Molecular and genetic mechanisms. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2025; 69(1): 92-101. (In Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.92-101

Author's contribution: concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing the text – Budaeva M.V.; editing the text – Melerzanov A.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Maria V. Budaeva*, PhD student at MIPT, Phystech School of Biological and Medical Physics, Biological Sciences, e-mail: budaeva.mv@phystech.edu

Information about the authors:

Budaeva M.V., <https://orcid.org/0009-0003-3565-4354>

Melerzanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4749-5851>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 19.12.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Список сокращений:

1. 4P-медицина (от англ. Personalized, Preventive, Predictive, Participatory; «персонализация, предсказательность, превентивность, партисипативность») современное направление организации медицинской помощи, данная концепция включает такие принципы, как – индивидуальный подход к каждому пациенту (персонализация); прогнозирование развития заболеваний (предикция); предотвращение появления заболеваний (превентивность или профилактика); мотивированное участие самого пациента в медицинских мероприятиях (партисипативность). В настоящее время ведутся дискуссии о концепции 5P-медицины с добавлением термина Precision (прецизионная) и 7P-медицины (Psychocognitive (психокогнитивная) и Public (публичная)) [1, 2].
2. СД2 (сахарный диабет 2 типа, англ. Type 2 diabetes mellitus (T2DM)) – хроническое нарушение метаболизма, характеризующееся избытком глюкозы в крови и нечувствительностью клеток к гормону инсулину.
3. КППГ (Конечные продукты гликирования, AGEs (Advanced glycation end products) – липиды или белки, подвергшиеся гликированию углеводами.
4. RAGE-рецепторы – рецепторы для конечных продуктов гликирования.

Введение

В современном мире все большее внимание уделяется превентивным мерам сбережения здоровья населения, становится более востребованной 4P-медицина [3]. В данной области медицины большое значение уделяется функциональному питанию. Существует проблема нерационального питания, в том числе недостаточного потребления белка и незаменимых аминокислот. Норму белка сложно поддерживать обычному человеку, даже если потреблять продукты с высоким

его содержанием [4, 5]. Согласно данным Федерального регистра сахарного диабета, в России наблюдается рост распространенности сахарного диабета, а также предиабета, который затрагивает каждого пятого. Более 40 процентов людей имеют лишний вес, что увеличивает риск развития диабета и осложнений [6]. Растущая распространенность сахарного диабета 2 типа (СД2) во всем мире представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения с далеко идущими последствиями [6]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), СД2 достиг масштабов эпидемии и поражает миллионы людей во всем мире [7]. Этот рост объясняется различными факторами, включая малоподвижный образ жизни, нездоровые пищевые привычки и старение населения. СД2 не только ложится тяжелым экономическим бременем на системы здравоохранения, но и приводит к огромному количеству осложнений, таких как сердечно-сосудистые заболевания, почечная недостаточность, слепота и ампутация нижних конечностей [8]. Кроме того, последствия СД2 выходят за рамки индивидуального здоровья, поскольку он способствует снижению производительности труда, увеличению инвалидности и ухудшению качества жизни больных и членов их семей [9].

Использование сахарозаменителей в качестве альтернативных подсластителей при лечении СД2 открывает перспективные возможности для смягчения негативных последствий избыточного потребления сахарозы для больных СД2. В отличие от натуральных сахаров, некоторые сахарозаменители обеспечивают сладкий вкус, не оказывая существенного влияния на уровень глюкозы в крови, что делает их пригодными для включения в диабетический рацион [10]. К распространенным заменителям сахара относятся непитательные подсластители, такие как аспартам, сахарин и стевия, а также сахарные спирты, такие как эритрит и ксилит. Эти заменители обладают широким диапазоном интенсивности сладости и часто используются

в качестве ингредиентов в различных продуктах питания и напитках, предназначенных для людей с СД2 [11]. Включая заменители сахара в свой рацион, страдающие СД2 могут употреблять сладкие продукты, контролируя уровень глюкозы в крови, снижая риск осложнений и улучшая общее качество жизни. Однако для обеспечения безопасного и эффективного использования каждого сахарозаменителя в лечении СД2 необходимо тщательно изучить его свойства, потенциальные побочные эффекты и нормативный статус.

Решение проблемы растущей распространенности СД2 требует многогранных подходов, включающих профилактику, раннее выявление, доступ к качественному медицинскому обслуживанию и эффективные стратегии управления с учетом индивидуальных потребностей.

Объяснение концепции персонализированной медицины и ее значения для лечения пациентов с СД2

Персонализированная медицина в лечении СД2 подразумевает индивидуализацию терапевтических стратегий на основе таких факторов, как генетические особенности, образ жизни и метаболические профили [12]. Используя достижения в области геномных технологий, таких как омиксные технологии, определения биомаркеров и анализа данных, медицинские работники могут разрабатывать целевые мероприятия, которые оптимизируют контроль уровня глюкозы, смягчают осложнения и улучшают общие результаты для пациентов с диабетом. Такой подход выходит за рамки традиционной универсальной модели, признавая гетерогенность фенотипов диабета и важность индивидуального подхода к лечению для достижения оптимальных результатов. Проведенные исследования по оценке связи между геномом и фенотипическими проявлениями заболеваний (GWAS (англ. genome-wide association studies) Полногеномный поиск ассоциаций) расширило понимание о генетической природе сахарного диабета 2 типа [13]. Секвенирование нового поколения (NGS - Next-generation sequencing) позволило провести транскриптомные, эпигеномные и микробиомные исследования по данному заболеванию [14]. Для комплексной оценки метаболического статуса человека Низкомолекулярные метаболиты в биологических образцах успешно анализируются методами масс-спектропии и ЯМР (ядерного магнитного резонанса) [15]. На качественное улучшение сбора данных о различных показателях пациентов (образ жизни, биохимические показатели) оказывает влияние стремительный темп развития цифровых технологий и носимых устройств (digital pharmaceuticals). Данные технологии также вносят вклад

в изменение образа жизни и выполнению врачебных рекомендаций [16].

4Р-медицина открывает большие перспективы для оказания медицинской помощи с учетом индивидуальных особенностей каждого пациента. Например, в исследовании [17] подчеркивается роль геномных технологий в выявлении генетических вариантов, связанных с ответом на конкретные препараты для лечения пациентов с СД2, что позволяет врачам назначать наиболее эффективную схему лечения для каждого пациента. Кроме того, выявление биомаркеров, как показано в исследованиях [18], позволяет медицинским работникам определять лиц с высоким риском развития диабетических осложнений и соответствующим образом адаптировать профилактические меры. Кроме того, достижения в области анализа данных [19] позволяют интегрировать различные данные о пациенте, такие как мониторинг уровня глюкозы, режим питания и уровень физической активности, для разработки персонализированных планов лечения, которые оптимизируют гликемический контроль.

Необходимость учета индивидуальных различий в реакции на лечение и прогрессирование СД2

Сахарный диабет – сложное метаболическое заболевание, характеризующееся нарушением секреции инсулина, инсулинорезистентностью и дисрегуляцией метаболизма глюкозы. Молекулярные механизмы, лежащие в основе диабета, включают сложное взаимодействие между различными клеточными процессами, генетическими факторами и влиянием окружающей среды.

Дисфункция секреции инсулина: при диабете 1 типа аутоиммунное разрушение β -клеток поджелудочной железы приводит к недостаточной выработке инсулина. При диабете 2 типа, напротив, происходит дисфункция β -клеток и нарушение секреции инсулина в ответ на повышение уровня глюкозы в крови. На молекулярном уровне эта дисфункция может быть результатом изменений внутриклеточных сигнальных путей, таких как сигнальный каскад инсулинового рецептора, факторы транскрипции панкреатических β -клеток (например, PDX1, FOXO1) и дисфункции митохондрий [20].

Инсулинорезистентность – отличительная черта диабета 2 типа, характеризующаяся снижением чувствительности определенных тканей (например, печени, мышц, жировой ткани) к действию инсулина. Молекулярные механизмы, способствующие развитию инсулинорезистентности, включают aberrантную сигнализацию через субстратные белки рецепторов инсулина (IRS – insulin receptor substrate), активацию воспалительных путей (например, транскрипционный фактор

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»), накопление внутриклеточных липидов (липотоксичность) и дисрегуляцию секреции адипокинов из жировой ткани [21].

Дисрегуляция метаболизма глюкозы: при диабете дисрегуляция метаболизма глюкозы нарушает баланс между поглощением, утилизацией и хранением глюкозы. Нарушенное поглощение глюкозы в инсулинорезистентных тканях и повышенное печеночное производство глюкозы способствуют развитию гипергликемии. На молекулярном уровне дисрегуляция ключевых ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы, таких как глюкокиназа, глюкозо-6-фосфатаза и гликогенсинтаза, может происходить из-за изменения экспрессии генов, посттрансляционных модификаций или доступности субстратов [22].

Воспалительный и окислительный стресс: хроническое воспаление низкой степени тяжести и окислительный стресс играют важнейшую роль в патогенезе диабета и его осложнений. Воспалительные медиаторы (например, фактор некроза опухоли (TNF- α), Интерлейкин 6 (IL-6)) и окислительные стрессоры нарушают сигнальные пути инсулина, ухудшают функцию β -клеток и способствуют развитию инсулинорезистентности. Молекулярные механизмы включают активацию стресс-реактивных киназ (например, N-концевые киназы c-Jun (JNK), ингибитор субъединицы бета-субъединицы киназы каппа-B ядерного фактора (IKK β)), факторов транскрипции (например, NF- κ B) и выработку активных форм кислорода (ROS) [23].

Генетические и экологические факторы: Генетическая предрасположенность в сочетании с факторами окружающей среды, такими как ожирение, малоподвижный образ жизни и диетические привычки, влияет на риск развития диабета и прогрессирование заболевания. При помощи GWAS было выявлено множество генетических вариантов, связанных с предрасположенностью к диабету, функцией β -клеток, инсулинорезистентностью и метаболизмом глюкозы [24]. Эти генетические факторы взаимодействуют с факторами окружающей среды, модулируя фенотипы диабета и методы лечения.

Особенности составления персонализированной диеты при СД2 с учетом генетических и других особенностей человека

Аминокислоты. В подходах персонализированной медицины для лечения и профилактики СД2 аминокислоты играют важную роль в воздействии на метаболические пути, секрецию инсулина и гомеостаз

глюкозы [25]. Конкретные аминокислоты, такие как аминокислоты с разветвленной цепью (ВСАА, (англ. branched-chain amino acids, аминокислоты с разветвленными боковыми цепями) и ароматические аминокислоты (ААА - aromatic amino acids) вовлечены в патогенез инсулинорезистентности и диабета. Повышенные уровни ВСАА и ААА наблюдаются у людей с инсулинорезистентностью, диабетом 2 типа и ожирением и связаны с нарушением инсулиновой сигнализации, дисфункцией β -клеток и дисрегуляцией метаболизма глюкозы. В контексте 4P-медицины стратегии составления рекомендаций по питанию, касающиеся метаболизма аминокислот, могут быть адаптированы к индивидуальным метаболическим профилям и потребностям. Например, диетические модификации, направленные на снижение потребления ВСАА и ААА с помощью ограничения белка или селективных аминокислотных добавок, могут помочь улучшить чувствительность к инсулину и гликемический контроль у людей с диабетом [26].

Кроме того, время приема и состав потребляемого белка могут быть индивидуализированы для оптимизации гликемического ответа и секреции инсулина индивидуума. Также показано, что некоторые аминокислоты, такие как аргинин и глицин, стимулируют секрецию инсулина и улучшают толерантность к глюкозе у людей с диабетом [27]. Поэтому индивидуальные диетические рекомендации могут включать повышенное потребление продуктов, богатых этими специфическими аминокислотами, таких как бобовые, орехи, семечки и нежирное мясо, для поддержания функции β -клеток поджелудочной железы и повышения секреции инсулина. Эти персонализированные подходы учитывают индивидуальные различия в метаболизме аминокислот, диетических предпочтениях и метаболических реакциях для разработки индивидуальных диетических рекомендаций, которые максимизируют терапевтический эффект и способствуют долгосрочному улучшению здоровья при лечении диабета.

Пребиотики. В персонализированной медицине для лечения диабета роль пребиотиков в рационе питания привлекает внимание благодаря их потенциалу модулировать состав микробиоты кишечника и улучшать метаболическое здоровье [28]. Пребиотики – это неперевариваемые пищевые волокна, которые избирательно стимулируют рост и активность полезных бактерий в кишечнике, таких как бифидобактерии и лактобациллы. Эти полезные бактерии производят короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) в качестве побочных продуктов метаболизма, которые, как было показано, оказывают противовоспалительное и мета-

болическое действие, включая улучшение чувствительности к инсулину и гомеостаза глюкозы.

Подходы персонализированной медицины учитывают индивидуальные различия в составе микробиоты кишечника и реакции на диетические вмешательства, что позволяет разрабатывать индивидуальные рекомендации по оптимизации приема пребиотиков для людей с диабетом [29]. Конкретные пребиотики, такие как инулин, фруктоолигосахариды (ФОС), галактоолигосахариды (ГОС) и резистентный крахмал, были изучены на предмет их потенциальной пользы в лечении диабета [30]. Например, индивидуальные диетические рекомендации могут включать увеличение потребления продуктов, богатых пребиотиками, таких как лук, чеснок, лук-порей, корень цикория, топинамбур и бобовые, для поддержания здорового состава микробиоты кишечника и улучшения метаболического здоровья [31].

Кроме того, пребиотические добавки могут быть назначены на основе индивидуальных профилей микробиоты кишечника и метаболических параметров для оптимизации терапевтических результатов. Более того, подходы персонализированной медицины могут учитывать индивидуальные факторы, такие как устойчивость желудочно-кишечного тракта, диетические предпочтения и чувствительность к лечению, чтобы разработать персонализированные пребиотические вмешательства, которые будут осуществимы и эффективны для каждого пациента [32]. Включая пребиотики в индивидуальные диетические рекомендации, медицинские работники могут использовать потенциал модуляции микробиоты кишечника для улучшения гликемического контроля, чувствительности к инсулину и общего метаболического здоровья у людей с диабетом [32].

Персонализированное лечение диабета может включать инновационные стратегии, адаптированные к пациентам с редкими и интересными генетическими мутациями. Более того, люди с мутациями в генах, участвующих в метаболизме глюкозы, таких как GCK (germinal center kinase) или HNF1A (hepatocyte nuclear factor 1-alpha) могут получить пользу от персонализированных диетических вмешательств, разработанных с учетом их специфического метаболического профиля [33]. Например, пациентам с мутациями GCK может потребоваться высокоуглеводная диета для стимуляции секреции инсулина, а пациентам с мутациями HNF1A – диета с низким гликемическим индексом для улучшения гликемического контроля [34]. Эти персонализированные стратегии лечения подчеркивают важность учета редких генетических мутаций при лечении диабета и подбора мероприятий, направленных на устранение молекулярных механизмов, лежащих в основе фенотипа заболевания.

Заменители сахара в диетическом рационе пациентов СД2

Сахарозаменители играют важную роль в составе диеты при СД2, так как обеспечивают сладкую альтернативу натуральным сахарам [35]. Некоторые сахарозаменители оказывают минимальное воздействие на уровень глюкозы в крови. Сахарозаменители бывают искусственными и натуральными. К искусственно синтезированным относятся аспартам, сахарин, сукралоза, и другие. Среди наиболее распространенных натуральных сахарозаменителей можно выделить стевию, полиолы (эритрит, ксилит), фруктозу. Отдельно стоит выделить полиолы, сахарные спирты, обеспечивающие сладость с меньшим количеством калорий и более низким гликемическим индексом по сравнению с сахарозой [35].

Эритрит, в частности, хорошо переносится и оказывает минимальное влияние на уровень сахара в крови, что делает его популярным выбором для людей с диабетом. Недавнее исследование, опубликованное в журнале Nature [36], обнаружило ассоциацию между повышенными уровнями эритрита в крови и увеличенным риском сердечно-сосудистых событий. Однако важно отметить, что это наблюдательное исследование не устанавливает причинно-следственную связь и требует дальнейших исследований для полного понимания механизма этой связи. В свете этих данных, хотя эритрит продолжает рассматриваться как безопасный сахарозаменитель, важно учитывать возможные индивидуальные риски и консультироваться с медицинскими специалистами при его употреблении. Ксилит, хотя и содержит немного больше калорий, также обладает стоматологическими преимуществами и широко используется в жевательных резинках без сахара и средствах по уходу за полостью рта [37]. В целом эти сахарозаменители предлагают людям с диабетом приемлемые варианты удовлетворения тяги к сладкому и при этом эффективно регулируют уровень сахара в крови.

В последнее время стали появляться сообщения о возможном применении композиции полиолов с цвиттерионными пластификаторами как потенциальных сахарозаменителей [38, 39]. Аминокислоты начинают рассматриваться перспективной альтернативой традиционным пластификаторам в полимерной науке благодаря своей экологичности и способности улучшать механические свойства полимеров [38]. В сочетании со способностью некоторых аминокислот обладать сладким вкусом и не вызывать значительного изменения уровня глюкозы в крови становится возможным разработка потенциальных сахарозаменителей на их основе.

Молекулярные механизмы действия сахарозаменителей

Анализ молекулярных взаимодействий между сахарозаменителями и клеточными мишенями, участвующими в метаболизме глюкозы и сигнальных путях инсулина. Молекулярные механизмы, лежащие в основе действия заменителей сахара, включают сложные взаимодействия между этими соединениями и клеточными мишенями в метаболизме глюкозы и сигнальных путях инсулина. Например, искусственные подсластители, такие как аспартам и сахарин, могут взаимодействовать с рецепторами сладкого вкуса на языке, запуская сигнальные каскады, которые в конечном итоге приводят к восприятию сладости без сопутствующего повышения уровня глюкозы в крови [40]. Кроме того, некоторые заменители сахара, такие как эритрит и ксилит, подвергаются минимальному метаболизму в организме и плохо усваиваются, что приводит к ограниченному воздействию на уровень глюкозы в крови [41]. Эритрит, сахарный спирт, всасывается в тонком кишечнике, но затем быстро выводится с мочой в неизменном виде, что приводит к минимальной калорийности и гликемическому эффекту. Аналогичным образом, ксилит не полностью всасывается в тонком кишечнике и подвергается ферментации кишечной микробиотой в толстом кишечнике. Такое ограниченное всасывание и метаболизм эритрита и ксилита объясняются их устойчивостью к ферментативному расщеплению пищеварительными ферментами, такими как α -амилаза и дисахаридазы [42].

Несмотря на это, как эритрит, так и ксилит могут взаимодействовать со специфическими рецепторами в желудочно-кишечном тракте, такими как рецепторы сладкого вкуса T1R2/T1R3, что приводит к активации нижележащих сигнальных путей. Эти пути часто включают циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и инозитолтрифосфат (IP3 – Inositol trisphosphate). Кроме того, активация рецепторов сладкого вкуса может стимулировать выделение кишечных гормонов, таких как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1 – Glucagon-like peptide-1) и пептид YY (PYY – peptide tyrosine tyrosine), которые могут влиять на чувство насыщения, метаболизм глюкозы и перистальтику желудочно-кишечного тракта [43]. В целом, ограниченный метаболизм и всасывание эритрита и ксилита в сочетании с их взаимодействием со специфическими рецепторами и сигнальными путями способствуют их использованию в качестве низкокалорийных заменителей сахара с минимальным воздействием на уровень глюкозы в крови.

Напротив, было показано, что некоторые аминокислоты, такие как глицин и аланин, модулируют секре-

цию инсулина и усвоение глюкозы посредством прямого взаимодействия с β -клетками поджелудочной железы и тканями, чувствительными к инсулину [44]. Например, было показано, что глицин активирует рецептор глицина (GlyR – glycine receptor) на β -клетках поджелудочной железы, что приводит к деполяризации мембран и притоку кальция, что в конечном итоге стимулирует секрецию инсулина. Кроме того, глицин может также действовать как соагонист рецептора N-метил-D-аспартата (NMD – N-methyl-d-aspartic acid), дополнительно усиливая секрецию инсулина [45]. С другой стороны, аланин участвует в активации рецепторов сладкого вкуса T1R2/T1R3 (Taste receptor type 1 member 2/ Taste receptor type 1 member 3) на языке, вызывая выделение кишечных гормонов, таких как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и пептид YY (PYY), которые, в свою очередь, стимулируют секрецию инсулина и способствуют усвоению глюкозы инсулином-чувствительные ткани, такие как скелетные мышцы и жировая ткань. Кроме того, было показано, что как глицин, так и аланин активируют сигнальные пути, такие как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/протеинкиназа B (Akt), что приводит к увеличению перемещения переносчика глюкозы 4-го типа (GLUT4) к клеточной мембране и усиленному усвоению глюкозы [46]. Понимание этих молекулярных взаимодействий дает ценную информацию о физиологических эффектах заменителей сахара и их потенциальном влиянии на метаболическое здоровье и лечение диабета. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения точных механизмов, лежащих в основе действия различных заменителей сахара, и их влияния на клеточные процессы, участвующие в метаболизме глюкозы и сигнальных путях инсулина.

Искусственные подсластители, такие как аспартам и сахарин, взаимодействуют с рецепторами сладкого вкуса на языке, запуская сигнальные каскады, которые в конечном итоге приводят к восприятию сладости. Эти рецепторы сладкого вкуса в основном включают гетеродимерные рецепторы, связанные с G-белком (GPCR – G-protein-coupled receptors), известные как рецепторы вкуса типа 1, члены 2 и 3 (T1R2/T1R3) [47]. При связывании подсластителей с этими рецепторами происходят конформационные изменения, активирующие связанный с ними G-белок густдудин [48]. Впоследствии активированный густдудин запускает нижележащие сигнальные пути, включая путь фосфолипазы C β 2 (PLC β 2 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2), что приводит к гидролизу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2 – Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) в инозитол-трифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG -

diacylglycerol). IP3 индуцирует высвобождение ионов кальция (Ca^{2+}) из внутриклеточных запасов, что приводит к деполяризации клеток вкусовых рецепторов и генерации потенциалов действия. DAG активирует протеинкиназу C (PKC), которая дополнительно модулирует активность ионных каналов и высвобождение нейромедиаторов, в конечном счете передавая сигнал о сладком вкусе в мозг.

Использование результатов молекулярных исследований для выяснения механизмов, лежащих в основе терапевтического действия сахарозаменителей при диабете

Молекулярные исследования выявили влияние заменителей сахара на паттерны экспрессии генов, клеточные сигнальные каскады и метаболические процессы, имеющие отношение к патогенезу диабета [49]. Объединив эти данные, исследователи могут определить ключевые молекулярные мишени и пути, посредством которых заменители сахара оказывают свое терапевтическое действие при диабете. Это всестороннее понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе терапевтического действия заменителей сахара, дает ценную информацию для разработки новых терапевтических стратегий и персонализированных вмешательств для лечения диабета.

Обзор генетических вариаций, связанных с восприятием вкуса, метаболизмом и реакцией на сахарозаменители. Генетические факторы играют решающую роль в том, как человек реагирует на заменители сахара, включая восприятие вкуса, обмен веществ и общую физиологическую реакцию [50].

Выявлены генетические вариации в генах вкусовых рецепторов, таких как TAS1R2 и TAS1R3, которые кодируют компоненты рецепторов сладкого вкуса, влияющие на индивидуальную чувствительность к сладкому и предпочтение определенных заменителей сахара. Кроме того, генетические полиморфизмы в генах, участвующих в углеводном обмене, таких как SLC2A2, кодирующий переносчик глюкозы GLUT2, могут влиять на эффективность использования заменителей сахара и последующие метаболические реакции [51]. Кроме того, вариации в генах, связанных с чувствительностью к инсулину и его секрецией, таких как INS и IRS1, могут способствовать межличностным различиям в контроле гликемии в ответ на заменители сахара. Изучая эти генетические факторы, исследователи могут получить представление о различных реакциях людей на заменители сахара и соответствующим образом адаптировать диетические мероприятия и индивидуальные подходы к лечению диабета [52].

Изучение генетических полиморфизмов в генах вкусовых рецепторов, метаболических ферментов и сигнальных молекул инсулина, которые могут влиять на индивидуальную реакцию на сахарозаменители. Изучение генетических полиморфизмов в генах вкусовых рецепторов, метаболических ферментах и сигнальных молекулах инсулина позволяет получить ценную информацию об индивидуальной реакции на заменители сахара [53].

Генетические вариации в генах вкусовых рецепторов, таких как TAS1R2 и TAS1R3, могут влиять на индивидуальную чувствительность к сладкому и предпочтение определенных заменителей сахара, влияя на выбор рациона питания и общий гликемический контроль.

Кроме того, полиморфизмы метаболических ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, включая такие гены, как SLC2A2 и HK1, кодирующие транспортеры глюкозы и гексокиназу [54] соответственно, могут влиять на эффективность использования заменителей сахара и последующие метаболические реакции. Также, вариации в генах, связанных с сигнальными путями инсулина, таких как INS и IRS1 [51] могут модулировать чувствительность и секрецию инсулина, потенциально влияя на гликемическую реакцию на заменители сахара.

Обсуждение потенциальных последствий влияния генетических факторов для персонализированных подходов к использованию сахарозаменителей в лечении диабета. Обсуждение потенциального влияния генетических факторов на персонализированные подходы к использованию заменителей сахара при лечении диабета подчеркивает важность индивидуального диетического питания [55]. Учитывая генетические полиморфизмы в генах рецепторов вкуса, метаболических ферментах и сигнальных молекулах инсулина, медицинские работники могут адаптировать рекомендации по заменителям сахара к генетическому профилю каждого человека. Например, людям с генетическими вариантами, связанными с повышенной потребностью к сладкому вкусу, могут быть полезны заменители сахара с более выраженным профилем сладости, в то время как людям с вариациями метаболических ферментов может потребоваться корректировка дозы или частоты употребления заменителей сахара для оптимизации метаболических реакций [51].

Кроме того, генетические факторы, влияющие на чувствительность и секрецию инсулина, могут повлиять на выбор заменителей сахара с минимальным воздействием на уровень глюкозы в крови у лиц с нарушенной функцией инсулина [56, 57]. Включение генетической информации в персонализированные подходы к использованию заменителей сахара позво-

ляет разработать более точные и эффективные стратегии лечения диабета, способствуя улучшению гликемического контроля и общего состояния здоровья людей с сахарным диабетом.

В настоящее время также уделяется внимание влиянию сахарозаменителей на сигнальные пути, связанные с RAGE-рецепторами, такими как AGE-RAGE путь [57]. Прогрессивное повышение уровней AGE происходит как часть нормального старения, увеличивает способность AGE необратимо сшивать белки и их способность запускать множество клеточных путей, ассоциированных со старением. Так I-арабиноза повышала активность пути AGE-RAGE в клетках Caco-2 (клеточная линия клеток колоректальной аденокарциномы человека) и HepG2 (клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека), что следует интерпретировать с осторожностью, поскольку в литературе нет данных о том, что I-арабиноза может негативно влиять на выработку AGE [58]. В работе [59] обсуждалось влияние сахарозаменителей на снижение конечных продуктов гликирования AGE, активных форм кислорода ROS и воспалительных факторов, таких как TNF- α , IL-6, внутриклеточного NF- κ B.

Также в методах цифровой медицины набирает популярность направление подбора персонализированного лечения СД2, включая индивидуальный подбор диеты [60]. Появляются компании, предлагающие услуги персонализированного подбора сахарозаменителей в составе программы цифровой терапии (Digital Therapeutics (DTx)). Так, в исследовании одной из таких компаний участники программы цифровой терапии демонстрировали значительное улучшение гликемического контроля и снижение веса и ИМТ [61].

Заключение

В обзоре подчеркивается важная роль заменителей сахара в лечении диабета и важность индивидуального подхода к их использованию. Изучая различные заменители сахара, включая искусственные подсластители, сахарные спирты и натуральные соединения, а также их молекулярные механизмы и метаболические эффекты, мы получили ценную информацию об их потенциальных преимуществах и ограничениях в плане контроля гликемии и общего лечения диабета. Более того, учет генетических факторов, вкусовых предпочтений и индивидуальных особенностей в стратегиях персонализированной медицины стал ключевым фактором для оптимизации использования заменителей сахара при лечении диабета. Адаптируя диетические рекомендации и планы лечения к уникальному генетическому профилю каждого пациента, метаболическому фенотипу

и предпочтениям образа жизни, медицинские работники могут повысить эффективность лечения, увеличить заинтересованность пациентов в лечении и, в конечном счете, улучшить состояние здоровья людей с сахарным диабетом. Непрерывные исследования, технологические достижения и междисциплинарное сотрудничество будут иметь важное значение для дальнейшего совершенствования персонализированных подходов к использованию заменителей сахара и перехода лечения сахарного диабета в новую эру точной медицины.

Литература

(п.п. 1-5; 7-11; 13-19; 22-61 см. References)

- Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А., Сазонова Д.В. и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010-2022 гг. *Сахарный диабет*. 2023; 26(2): 104-23. <https://doi.org/10.14341/DM13035>
- Салухов В.В., Ромашевский Б.В. Роль персонализированной медицины в профилактике сахарного диабета 2 типа. *Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски*. 2019; 3(2): 654-65. ISSN 2521-6562
- Калмыкова З.А., Кононенко И.В., Смирнова О.М., Шестакова М.В. Сигнальные пути гибели β -клеток при сахарном диабете 2 типа: роль врожденного иммунитета. *Сахарный диабет*. 2020; 23(2): 174-84. <https://doi.org/10.14341/DM10242>
- Ткачук В.А., Воротников А.В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. *Сахарный диабет*. 2014; 17(2): 29-40. <https://doi.org/10.14341/DM2014229-40>

References

- Blobel B., Oemig F., Ruotsalainen P., Lopez D.M. Transformation of health and social care systems-an interdisciplinary approach toward a foundational architecture. *Frontiers in medicine*. 2022; 9: 802487. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.802487>
- Sriram R.D., Reddy S.S.K. Artificial intelligence and digital tools: future of diabetes care. *Clinics in geriatric medicine*. 2020; 36(3): 513-25. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2020.04.009>
- Slim K., Sely M., Veziat J. Conceptual innovation: 4P medicine and 4P surgery, *Journal of Visceral Surgery*. 2021; 158(3S): S12-S17. <https://doi.org/10.1016/j.jvisurg.2021.01.003>
- Kitada M., Ogura Y., Monno I., Koya D. The impact of dietary protein intake on longevity and metabolic health. *EBioMedicine*. 2019; 43: 632-40. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.005>
- Ly Y., Kraus V.B., Gao X., Yin Z., Zhou J., Mao C., et al. Higher dietary diversity scores and protein-rich food consumption were associated with lower risk of all-cause mortality in the oldest old. *Clinical nutrition*. 2020; 39(7): 2246-54. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.10.012>
- Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K., Zheleznyakova A.V., Isakov M.A., Sazonova D.V., et al. Diabetes mellitus in the Russian Federation: dynamics of epidemiological indicators according to the Federal Register of diabetes mellitus for the period 2010-2022. *Sakharnyi diabet*. 2023; 26(2): 104-23. <https://doi.org/10.14341/DM13035> (in Russian)
- Sun H., Saeedi P., Karuranga S., Pinkepank M., Ogurtsova K., Duncan B.B., et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-

- level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*. 2022; 183: 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
8. Lu Y., Wang W., Liu J., Xie M., Liu Q., Li S. Vascular complications of diabetes: A narrative review. *Medicine (Baltimore)*. 2023; 102(40): e35285. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000035285>
 9. Tomic D., Shaw J.E., Magliano D.J. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology*. 2022; 18(9): 525–39. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00690-7>
 10. Teyssie F., Bordier V., Beglinger C., Wölnerhanssen B.K., Meyer-Gerspach A.C. Metabolic effects of selected conventional and alternative sweeteners: a narrative review. *Nutrients*. 2024; 16(5): 622. <https://doi.org/10.3390/nu16050622>
 11. Miller P.E., Perez V. Low-calorie sweeteners and body weight and composition: a meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2014; 100(3): 765–77. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.082826>
 12. Salukhov V.V., Romashevskiy B.V. Personalized medicine and its role in type 2 diabetes prevention. *Neotlozhnaya kardiologiya i kardiovaskulyarnye riski*. 2019; 3(2): 654–65. ISSN 2521–6562
 13. Zhang S., Shu H., Zhou J., Rubin-Sigler J., Yang X., Liu Y., et al. Deconvolution of polygenic risk score in single cells unravels cellular and molecular heterogeneity of complex human diseases. *bioRxiv: the preprint server for biology*. 2024; 05(14): 594252. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93343>
 14. Tonyan Z.N., Nasykhova Y.A., Danilova M.M., Barbitoff Y.A., Changalidi A.I., Mikhaилоva, A.A., et al. Overview of transcriptomic research on type 2 diabetes: challenges and perspectives. *Genes*. 2022; 13(7):1176. <https://doi.org/10.3390/genes13071176>
 15. Wilkinson D.J., Crossland H., Atherton P.J. Metabolomic and proteomic applications to exercise biomedicine. *Translational exercise biomedicine*. 2024; 1(1): 9–22. <https://doi.org/10.1515/teb-2024-2006>
 16. Ramírez Gallego I., Marina Arroyo M., López-González, Á.A., Vicente-Herrero M.T., Vallejos D., Sastre-Alzamora T., et al. The effect of a program to improve adherence to the mediterranean diet on cardiometabolic parameters in 7034 Spanish workers. *Nutrients*. 2024; 16(7): 1082. <https://doi.org/10.3390/nu16071082>
 17. Pranata S., Wu S.V., Alizargar J., Liu J.H., Liang S.Y., Lu Y.Y. Precision health care elements, definitions, and strategies for patients with diabetes: a literature review. *International journal of environmental research and public health*. 2021; 18(12): 6535. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126535>
 18. Thorand B., et al. A panel of 6 biomarkers significantly improves the prediction of type 2 diabetes in the MONICA/KORA study population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021; 106(4): 1647–59. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa953>
 19. Chou P.-L., Chiang I.-H., Lin C.-W., Wang H.-H., Wang H.-K., Huang C.-H., et al. Newly diagnosed type 2 diabetes care between family physicians, endocrinologists, and other internists in Taiwan: a retrospective population-based cohort study. *Journal of Personalized Medicine*. 2022; 12(3): 461. <https://doi.org/10.3390/jpm12030461>
 20. Kalmykova Z.A., Kononenko I.V., Smirnova O.M., Shestakova M.V. Signaling pathways of β -cell death in type 2 diabetes mellitus: the role of innate immunity. *Sakharnyy diabet*. 2020; 23(2): 174–84. <https://doi.org/10.14341/DM10242> (in Russian)
 21. Tkachuk V.A., Vorotnikov A.V. Molecular mechanisms of insulin resistance development. *Sakharnyy diabet*. 2014; 17(2): 29–40. <https://doi.org/10.14341/DM2014229-40> (in Russian)
 22. Yang Y.H., Wen R., Yang N., Zhang T.N., Liu C.F. Roles of protein post-translational modifications in glucose and lipid metabolism: mechanisms and perspectives. *Molecular medicine*. 2023; 29(1): 93. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00684-9>
 23. de Deus I.J., Martins-Silva A.F., Fagundes M.M.A., Paula-Gomes S., Silva F.G.D.E., da Cruz, L.L., et al. Role of NLRP3 inflammasome and oxidative stress in hepatic insulin resistance and the ameliorative effect of phytochemical intervention. *Frontiers in pharmacology*. 2023; 14: 1188829. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1188829>
 24. Christiansen C.E., Arathimos R., Pain O., Molokhia M., Bell J.T., Lewis C.M. Stratified genome-wide association analysis of type 2 diabetes reveals subgroups with genetic and environmental heterogeneity. *Human molecular genetics*. 2023; 32(16): 2638–45. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddad093>
 25. Guo Y., Huang Z., Sang D., Gao Q., Li, Q. The role of nutrition in the prevention and intervention of type 2 diabetes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020; 8: 575442. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.575442>
 26. Trautman M.E., Richardson N.E., Lamming D.W. Protein restriction and branched-chain amino acid restriction promote geroprotective shifts in metabolism. *Aging cell*. 2022; 21(6): e13626. <https://doi.org/10.1111/acel.13626>
 27. Ding Y., Wang S., Lu J. Unlocking the potential: amino acids' role in predicting and exploring therapeutic avenues for type 2 diabetes mellitus. *Metabolites*. 2023; 13(9): 1017. <https://doi.org/10.3390/metabo13091017>
 28. Hernández-Calderón P., Wiedemann L., Benítez-Páez A. The microbiota composition drives personalized nutrition: Gut microbes as predictive biomarkers for the success of weight loss diets. *Frontiers in nutrition*. 2022; 9: 1006747. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1006747>
 29. Aydin Ö., Nieuwdorp M., Gerdes, V. The gut microbiome as a target for the treatment of type 2 diabetes. *Current diabetes reports*. 2018; 18(8): 55. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1020-6>
 30. Megur A., Daliri E.B., Baltrikienė D., Burokas A. Prebiotics as a tool for the prevention and treatment of obesity and diabetes: classification and ability to modulate the gut microbiota. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23(11): 6097. <https://doi.org/10.3390/ijms23116097>
 31. Hughes R.L., Alvarado D.A., Swanson K.S., Holscher H.D. The prebiotic potential of inulin-type fructans: a systematic review. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 2022; 13(2): 492–529. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab119>
 32. Gibbons S.M., Gurry T., Lampe J.W., Chakrabarti A., Dam V., et al. Perspective: leveraging the gut microbiota to predict personalized responses to dietary, prebiotic, and probiotic interventions. *advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 2022; 13(5): 1450–161. <https://doi.org/10.1093/advances/nmac075>
 33. Li L.M., Jiang B.G., Sun L.L. HNF1A: from monogenic diabetes to type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus. *frontiers in endocrinology*. 2022; 13: 829565. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.829565>
 34. Sousa M., Rego T., Armas J.B. Insights into the genetics and signaling pathways in maturity-onset diabetes of the young. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23(21): 12910. <https://doi.org/10.3390/ijms232112910>
 35. Rice T., Zannini E., Arendt E., Coffey A. A review of polyols - biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2020; 60(12): 2034–51. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1625859>
 36. Witkowski M., Nemet I., Alamri H., Wilcox J., Gupta N., Nimer N., et al. The artificial sweetener erythritol and cardiovascular event risk. *Nature medicine*. 2023; 29(3): 710–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02223-9>

37. ALHumaid J., Bamashmou M. Meta-analysis on the effectiveness of xylitol in caries prevention. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2022; 12(2), 133–8. https://doi.org/10.4103/jispcd.jispcd_164_21
38. van der Sman R.G.M., van den Hoek I.A.F., Renzetti. Sugar replacement with zwitterionic plasticizers like amino acids. *Food Hydrocolloids*. 2020; 109: 106113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106113>
39. Renzetti S., van den Hoek I.A.F., van der Sman R.G.M. Amino acids, polyols and soluble fibres as sugar replacers in bakery applications: Egg white proteins denaturation controlled by hydrogen bond density of solutions. *Food Hydrocolloids*. 2020; 108: 106034 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106034>
40. von Molitor E., Riedel K., Krohn M., Hafner M., Rudolf R., Cesetti T. Sweet taste is complex: signaling cascades and circuits involved in sweet sensation. *Frontiers in human neuroscience*. 2021; 15: 667709. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.667709>
41. Mazi T.A., Stanhope K.L. Erythritol: an in-depth discussion of its potential to be a beneficial dietary component. *Nutrients*. 2023; 15(1): 204. <https://doi.org/10.3390/nu15010204>
42. Bordier V., Teyssie F., Senner F., Schlotterbeck G., Drewe J., Beglinger C., et al. Absorption and metabolism of the natural sweeteners erythritol and xylitol in humans: a dose-ranging study. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23(17): 9867. <https://doi.org/10.3390/ijms23179867>
43. Martin A.M., Sun E.W., Keating D.J. Mechanisms controlling hormone secretion in human gut and its relevance to metabolism. *The Journal of endocrinology*. 2019; 244(1): 1–15. <https://doi.org/10.1530/joe-19-0399>
44. Noguchi G.M., Huising M.O. Integrating the inputs that shape pancreatic islet hormone release. *Nature metabolism*. 2019; 1(12): 1189–201. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0148-2>
45. Rorsman P., Ashcroft F.M. Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: of mice and men. *Physiological reviews*, 2018; 98(1): 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
46. Shimomura H., Ito M., Nishiyama A., Tanizawa T., Takeshima Y., Nishimaru H., et al. Glycine plays a crucial role as a co-agonist of NMDA receptors in the neuronal circuit generating body movements in rat fetuses. *Neuroscience research*. 2015; 97: 13–9. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.03.004>
47. Borozdina N.A., Dyachenko I.A., Popkova, D.V. Promising directions for regulating signaling pathways involved in the type 2 diabetes mellitus development (a review). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2024; 50(4): 1263–84. <https://doi.org/10.1134/S1068162024040137>
48. Zhao S., Zheng H., Lu Y., Zhang N., Soladoye O.P., Zhang Y., et al. Sweet taste receptors and associated sweet peptides: insights into structure and function. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2023; 71(38): 13950–64. [10.1021/acs.jafc.3c04479](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04479)
49. Sukumaran S.K., Palayyan S.R. Sweet taste signaling: the core pathways and regulatory mechanisms. *International journal of molecular sciences*. 2022; 71(38): 13950–64. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04479>
50. Mohajer N., Du C.Y., Checkcinco C., Blumberg B. Obesogens: how they are identified and molecular mechanisms underlying their action. *Frontiers in endocrinology*, 2021; 12: 780888. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.780888>
51. Diószegi J., Llanaj E., Ádány R. Genetic background of taste perception, taste preferences, and its nutritional implications: a systematic review. *Frontiers in genetics*. 2019; 10: 1272. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01272>
52. Li M., Chi X., Wang Y., Setrerrahmane S., Xie W., Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal transduction and targeted therapy*. 2022; 7(1): 216. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0>
53. Ling C., Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell metabolism*. 2019; 29(5): 1028–44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>
54. Melis M., Mastinu M., Naciri L.C., Muroli P., Barbarossa T.I. Associations between sweet taste sensitivity and polymorphisms (SNPs) in the TAS1R2 and TAS1R3 genes, gender, PROP taster status, and density of fungiform papillae in a genetically homogeneous Sardinian cohort. *Nutrients*, 2022; 14(22): 4903. <https://doi.org/10.3390/nu14224903>
55. Li C., Yang Y., Liu X., Li Z., Liu H., Tan Q. Glucose metabolism-related gene polymorphisms as the risk predictors of type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2020; 12(1): 97. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00604-5>
56. Kiani A.K., Bonetti G., Donato K., Kaftalli J., Herbst K. L., Stuppia L., et al. Polymorphisms, diet and nutrigenomics. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 2022; 63(2 Suppl 3), E125–E141. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2754>
57. Fernández-Carrión R., Sorlí J.V., Coltell O., Pascual E.C., Ortega-Azorín C., Barragán R., et al. Sweet taste preference: relationships with other tastes, liking for sugary foods and exploratory genome-wide association analysis in subjects with metabolic syndrome. *Biomedicine*, 2021; 10(1): 79. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010079>
58. Himanshu D., Ali W., Wamique M. Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2020; 19(2): 1959–66. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00641-x>
59. Zgutka K., Tkacz M., Tomasiak P., Tarnowski M. A role for advanced glycation end products in molecular ageing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(12): 9881. <https://doi.org/10.3390/ijms24129881>
60. van Laar A., Grootaert C., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Desmet T., Beerens K., et al. Metabolism and health effects of rare sugars in a CACO-2/HepG2 coculture model. *Nutrients*. 2022; 14(3): 611. <https://doi.org/10.3390/nu14030611>
61. Schiano C., Grimaldi V., Scognamiglio M., Costa D., Soricelli A., Nicoletti G.F., et al. Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners? *Food Research International*. 2021; 142: 110220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110220>

Сведения об авторах:

Будаева Мария Вячеславовна, аспирант ФГАОУ ВО МФТИ, физтех-школа биологической и медицинской физики, биологические науки;

Мелерзанов Александр Викторович, канд. мед. наук, доцент, заместитель директора института «Биофизики Будущего» ФГАОУ ВО МФТИ.

© Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В., 2025

УДК 616-093/-098

Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В.**Микробный метаболом кишечника: современные данные и перспективы практического применения**

ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ, 129090, Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3, корп. 1

Исследования последнего десятилетия показали непосредственное участие кишечного микробиома и его метаболитов в регуляции жизненно важных процессов в организме человека. Обнаружено непосредственное воздействие микробного метаболома на центральный (конструктивный и энергетический) метаболизм человека, углеводный и липидный обмен. Наиболее изученными составляющими микробного метаболома являются короткоцепочечные жирные кислоты и продукты метаболизма ароматических аминокислот, синтез которых осуществляется как строгими анаэробами, так и факультативно-анаэробными обитателями кишечника человека. Показано, что кишечный микробный метаболом непосредственно вовлечен в синтез вторичных жирных кислот. Он также является участником нейроэндокринных взаимодействий. Полученные данные делают необходимым пересмотреть подходы к профилактике, а также схемы диагностики ряда патологий, в основе которых лежат метаболические нарушения. Ведется поиск микробных метаболитов, которые можно было бы использовать в качестве биомаркеров, позволяющих уточнять диагноз или стадии заболевания. Для этого предполагается разработка индивидуальных профилей клинически значимых микробных метаболитов человека. Результаты исследования метаболома открывают реальные перспективы для создания новых пероральных форм лекарственных препаратов, позволяющих минимизировать возможное вмешательство кишечной микрофлоры. Представляется весьма реальным создание синбиотиков, с учетом индивидуальных особенностей организма человека.

Ключевые слова: микробный метаболом кишечника; короткоцепочечные жирные кислоты; ароматические аминокислоты; биомаркеры метаболических нарушений; метаболическое дактилоскопирование; синбиотики.

Для цитирования: Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В. Микробный метаболом кишечника: современные данные и перспективы практического применения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 102–110.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.102-110

Участие авторов: концепция, участие в организации процесса, написание текста статьи – Евдокимова Н.В.; корректура и редактирование – Черненькая Т.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.10.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V.**Microbial metabolome of the intestine: Current data and prospects for practical application**

Sklifosovskiy Research Institute of Emergency Medicine, 3, Bldg. 1 Bolshaya Sukharevskaya, Moscow, 129090, Russian Federation

Studies of the last decade have shown the direct involvement of the intestinal microbiome and its metabolites in the regulation of vital processes in the human body. The microbial metabolome directly influences the central human metabolism (catabolism and anabolism), carbohydrate and lipid metabolism. The best studied components of the intestinal microbial metabolome are short-chain fatty acids and metabolic products of aromatic amino acids produced both by strict anaerobes and facultative anaerobic intestinal microorganisms. It was shown that the intestinal microbial metabolome is directly involved in the synthesis of secondary fatty acids. Also, it takes part in neuroendocrine interactions. The available data warrant reviewing the approaches to diagnostics and prevention of a number of pathologies resulting from metabolic disorders. The search for microbial metabolites that could be used as biomarkers to clarify the diagnosis or stages of the disease is under way. For this purpose, it is proposed to develop individual profiles of clinically significant human microbial metabolites. The metabolome studies are promising for the creation of new oral drugs that would minimize the possible interference of the intestinal microflora. For the same purposes, it seems realistic to create synbiotics taking into account individual characteristics of the human body.

Keywords: intestinal microbial metabolome; short-chain fatty acids; aromatic amino acids; biomarkers of metabolic disorders; metabolic fingerprinting; synbiotics

For citation: Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V. Microbial metabolome of the intestine: Current data and prospects for practical application. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 102–110.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.102-110

Author's contribution: participation in the organization of the process, writing the text – Evdokimova N.V.; correction, editing the text of the article approval – Chernenkaya T.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Natalya V. Evdokimova**, senior researcher at the laboratory of clinical microbiology, PhD, Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Public Healthcare Institution of Moscow Healthcare Department, 3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129090, Russian Federation, e-mail: env1111@yandex.ru

Information about the authors:

Evdokimova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7473-8727>

Chernenkaya T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6167-7117>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 16.10.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Исследования последнего десятилетия показали, что микробиом кишечника является важнейшим игроком в регулировании функционального состояния человека. Он участвует не только в процессах переваривания пищи и синтезе разнообразных метаболитов из пищевых субстратов. Путем трансформации эндогенных соединений организма человека микробные метаболиты участвуют в регуляции работы многих органов и систем. Показано, что определенные классы микробных метаболитов, в частности, желчные кислоты, короткоцепочечные жирные кислоты, триметиламиноксид, производные триптофана и индола, вовлечены в патогенез метаболических нарушений. Предполагается, что определенные группы микробных метаболитов, циркулирующих в системном кровотоке, можно рассматривать как потенциальные биомаркеры для ранней диагностики и прогноза развития метаболического синдрома, жирового гепатоза печени, диабета 2 типа, нефропатии, сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных заболеваний. Знания о том, как работают микробные метаболиты и их производные, также можно использовать при разработке новых лекарственных препаратов.

В настоящем обзоре мы рассмотрим свидетельства прямой вовлеченности микробиома и его метаболитов в регуляцию метаболизма человека, а также приведем примеры наиболее изученных классов микробных метаболитов, которые, по современным представлениям, активно взаимодействуют с организмом человека и напрямую участвуют в поддержании здоровья или в развитии патологических состояний. Мы также попыта-

емся представить перспективные точки приложения этих знаний к решению задач медицинской практики.

Кратко о терминологии и методологии

Впервые термин «метабомика» был использован в 2009 г. Метаболомикой назвали область исследований, которая «направлена на оценку и прогнозирование риска развития заболеваний человека путем изучения метаболических особенностей организма, на которые влияют генетика, эпигенетика, воздействуют окружающая среда, диета и поведение» [1]. В настоящее время среди геномных технологий, используемых в исследованиях эндогенных соединений человека, выделяют подразделения, изучающие крупные биополимерные соединения (протеомику, липидомику) и метаболомику, которая исследует небольшие молекулы, массой не более 1500 Да. По сути, метаболомика является аналогом клинической биохимии с той лишь разницей, что спектр исследуемых веществ у нее значительно шире и используются экспресс-методы, которые более производительны и дешевле классических методов. Метаболомика тесно связана с геномикой, протеомикой и транскриптомикой (изучает работу и регуляцию работы генов синтеза РНК). Благодаря проекту «Геном человека» («The Human Genome Project») в настоящее время в свободном доступе имеется обширная база данных по геному, протеому и транскриптому человека [2].

Начатые в 2004 г. работы по систематизации всего того, что уже было известно об эндогенных метаболитах (сведения, накопленные за предшествующие 70 лет), продолжились 15-летним марафоном (с 2007 по 2022 гг). Результатом всего этого явилось создание единой базы данных метаболитов, обнаружен-

ных в организме человека — «Метаболом человека. версия 5.0» (“Human Metabolome Database 5.0, HMDB”, <https://hmdb.ca>) [3]. В этой базе представлена подробная информация о 217 920 веществах разных классов.

В метаболомике доминируют два взаимодополняющих метода исследования: спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) и масс-спектрометрия (МС) [4, 5]. Как вспомогательные используют разнообразные варианты хроматографических методов (газо-жидкостная, газовая, жидкостная хроматографии).

Для исследований в метаболомике наиболее активно применяют несколько МС-технологий, которые обладают рядом преимуществ: недорогие, экспрессные, обеспечивают высокую чувствительность и специфичность анализов [5]. Изучение липидов на основе МС (липидомика) стало особенно плодотворной областью медицинских исследований. Однако некоторые методы МС требуют тщательной подготовки образцов, проведения многоуровневого контроля. Узким местом остается этап выделения метаболитов из образцов. Структурное разнообразие метаболома более богатое, чем у генома, транскриптома или протеома. При этом невозможно разработать универсальный протокол для исследований любого вещества, и поэтому протоколы, в соответствии с которыми эффективно извлекают очень гидрофильные вещества, такие как молочная кислота, не подходят для липидов [5].

Анализ и интерпретация данных в рамках «омических» наук остаются самым сложным этапом. В метаболомике ситуация усложняется еще тем обстоятельством, что в зависимости от решаемой задачи применяют два разных подхода — целевой и нецелевой, позволяющие получать разноплановую информацию.

Целевой подход состоит в поиске заданной группы соединений. Такого рода исследования являются высокочувствительными, специфичными и воспроизводимыми, особенно когда для маркировки веществ используют тяжелые изотопы, а инструментальные методы имеют узкую направленность. С другой стороны, нецелевые подходы призваны дать общую картину метаболизма. Методы нецелевого подхода, как правило, не количественные. Однако они позволяют выявить новые, заранее неизвестные вещества, и сравнить их содержание в разных образцах [5]. Таким образом, этот подход наиболее эффективно используется в диагностических целях, когда производится оценка физиологического состояния человека по изменению спектра метаболитов. Одним из примеров является нецелевая метаболомика мочи, в которой присутствуют не только классические метаболиты из известных биохими-

ческих цепочек, но и трансформированные пищевые добавки, лекарственные препараты, микробные метаболиты и вещества с неизвестной идентичностью [5].

В настоящее время оценка вклада микробных метаболитов в общий метаболом человека далека от завершения. Микробное происхождение тех или иных метаболитов или потенциальную активность конкретных биосинтетических путей не всегда удается установить, исходя лишь из наличия тех или иных генетических детерминант. Этому препятствуют сложные механизмы регуляции активности генов и последующие эпигенетические трансформации.

Влияние микробных метаболитов на центральный метаболизм человека

Изучение системных метаболических нарушений, таких как метаболический синдром, жировой гепатоз печени, диабет 2 типа, нефропатия и сердечно-сосудистые заболевания, показало важную (если не сказать центральную) роль кишечной микробиоты в поддержании общего метаболического равновесия в организме человека [6, 7]. Однако невероятное структурное разнообразие микробиомов создает чрезвычайно пеструю картину и затрудняет анализ полученных результатов. Выявление и исследование профиля микробных метаболитов как внутри кишечника, так и вне его позволяет установить некие базовые, универсальные механизмы поддержания метаболического гомеостаза [8].

Исследователи метаболомов полагают, что открывшаяся возможность исследования флуктуаций определенных «сигнальных» метаболитов может оказаться весьма продуктивной в диагностических целях. Уже сейчас имеется немало свидетельств непосредственного влияния микробных метаболитов на физиологическое состояние человека. Так, одним из побочных нежелательных последствий приема антибиотиков являются сдвиги в эффективности получения энергии, добываемой из пищевых субстратов [8, 9]. Об этом свидетельствует значительное увеличение массы тела у принимавших антибактериальные препараты пациентов, даже на фоне низкокалорийных диет [9]. Эти нарушения удавалось временно смягчить путем фекальной трансплантации. Для этого использовали материал, взятый у здоровых доноров с нормальной массой тела [9]. Еще один пример: при изучении метаболических нарушений у курильщиков обнаружено переключение с потребления холина на метаболизм глицина и накопление производных глицина микробного происхождения (диметилглицин, N-ацетилглицин), которые изменяют эффективность использования энергии, получаемой из пищи [10]. Именно с накоплением этих

метаболитов связывают набор веса при отказе от курения. Эксперименты по фекальной трансплантации показали, что эта ситуация является обратимой, и введение кишечного микробиома некурящих людей позволяет нивелировать эти нежелательные последствия.

В ходе ряда исследований было обнаружено, что регулирование пищевого поведения также осуществляется с участием микробных метаболитов [10]. Например, короткоцепочечные жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират), являющиеся продуктами анаэробного микробного брожения, запускают синтез ряда пептидных гормонов (глюкагонподобные пептиды GLP-1 и YY), участвующих в регулировании чувства голода и насыщения [10]. Также было показано, что некоторые штаммы кишечной палочки способны синтезировать гормоноподобные пептиды, регулирующие формирование чувства насыщения у подопытных животных [11].

Взаимосвязь между потреблением энергии организмом человека и микробиомом является важной составляющей метаболического гомеостаза. Энергетический баланс, очевидно, складывается не только из потребления, но и из сбалансированного расходования энергии. Интересные работы по изучению термогенеза у детей первых лет жизни показывают, что микробиота кишечника влияет на выработку тепла бурой жировой тканью [12].

Изучение влияния микробиома кишечника на энергетический метаболизм человека пока находится на стадии констатации того или иного феномена, и картина того, как регулируются процессы энергетического обмена, пока остается не до конца ясной.

Производные ароматических аминокислот

Среди ключевых метаболитов, которые вовлечены во взаимодействие микробиома кишечника с организмом человека, особое место занимает незаменимая ароматическая аминокислота триптофан. В кишечнике человека реализуются три основных пути метаболизма триптофана, которые находятся под прямым или косвенным контролем микроорганизмов: синтез серотонина, синтез кинуренина и синтез производных индола [13]. Среди метаболитов триптофана микробное происхождение с достаточной долей уверенности установлено для кинуренина и триптамина: показана способность их синтеза чистыми культурами строгих анаэробов, таких как клостридии и руминококки. [14]. Триптамин стимулирует высвобождение серотонина в клетках толстой кишки, что усиливает моторику кишечника. Кинуренин участвует во многих процессах, в том числе в работе иммунной системы, в защите сет-

чатки глаза от ультрафиолетового воздействия. Производные триптофана микробного происхождения вовлечены в регуляцию работы базовых систем организма, начиная от роста и развития, до адаптации иммунной, пищеварительной и нервной системы человека к стрессовому воздействию факторов внешней среды [15].

Изучение влияния продуктов метаболизма фенилаланина, тирозина и триптофана, которые были синтезированы чистой культурой строгой анаэробной палочки *Clostridium sporogenes*, показало, что большая часть этих метаболитов (9 из 12 обнаруженных) способны изменять проницаемость кишечника и вызывать иммунный ответ у гнотобиотических мышей [16].

Значимая роль ароматических аминокислот в регулировании чувства голода и насыщения была показана на модельных организмах. Интересно, что после введения в кишечник культур *Acetobacter pomorum* и *Lactobacilli spp.* чувство голода, вызванное белковым голоданием, притуплялось [17].

Таким образом, продукты микробного метаболизма ароматических аминокислот участвуют в поддержании метаболического равновесия в организме человека, в частности, в регуляции работы иммунной и нервной системы.

Метаболическая активность микробиома и липидный обмен человека

Липиды представляют собой важнейший класс макромолекул, и их метаболизм также в значительной мере находится под контролем кишечной микрофлоры [1, 18]. Введение антибиотиков, подавляющих микробную активность, сокращает абсорбцию жиров в кишечнике крыс [18]. Исследования, проведенные с клеточной культурой, показали, что бактерии *Lactobacillus paracasei* и *Escherichia coli* способны регулировать липидный метаболизм энтероцитов [19]. Как считают исследователи, выявление узловых точек регуляции липидного метаболизма энтероцитов позволит в будущем использовать культуры бактерий или их метаболиты для лечения ожирения, профилактики атеросклероза и других заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена.

Как следует из результатов изучения профилей генов и их экспрессии в кишечнике человека и животных, некоторые микроорганизмы (представители рода *Clostridium* (IV геногруппы)) синтезируют дегидрогеназы, восстанавливающие холестерин до копростанола [20]. Копростанол – чрезвычайно устойчивое вещество, которое в дальнейшем не участвует в процессах биodeградации. Показано, что присутствие копростанолобразующих микроорганизмов в кишечном ми-

кrobiоме коррелирует с низким уровнем холестерина в крови и в фекалиях [21]. Иными словами, микробиота кишечника способна регулировать уровень холестерина в крови, и этот факт предполагают использовать при разработке новых стратегий лечения сердечно-сосудистых заболеваний. На основе этих находок уже сейчас производятся ферментативные препараты микробного происхождения, нацеленные на снижение уровня холестерина (Cholesterol dehydrogenases from *Nocardia sp.*, Sigma-Aldrich, США).

Еще один механизм микробной регуляции липидного обмена базируется на взаимодействии микробиома с желчью, а точнее с желчными кислотами. Желчные кислоты и их соли являются конечными продуктами катаболизма холестерина, а также важнейшими компонентами многих сигнальных путей, регулирующих не только липидный, но энергетический обмен человека [22]. С начала 1960-х г. было известно, что микробы трансформируют желчные кислоты человека несколькими путями, среди которых наиболее важными являются реакции конъюгации-деконъюгации с аминокислотами (глицином или таурином). Таким путем увеличивается пул вторичных жирных кислот, что не может не сказаться на метаболической активности и микробиома кишечника, и организма человека [23]. При патологических состояниях любое нарушение равновесия в циркуляции жирных кислот приводит к серьезным, порой необратимым, последствиям. Так показано, что дисбаланс в сторону накопления вторичных жирных кислот, многие из которых токсичны для клеток эпителия кишечника и гепатоцитов, приводит к развитию цирроза печени, воспалительным заболеваниям кишечника и онкозаболеваниям [23].

Результаты недавних исследований показали, что на процессы абсорбции липидов клетками кишечника влияет взаимодействие кишечного микробиома, его метаболитов с иммунной системой. Например, клетки лимфоидной ткани, находящиеся под контролем микробных метаболитов, участвуют в синтезе IL-22. Он, в свою очередь, контролирует экспрессию генов, кодирующих синтез компонентов транспортной системы мембран энтероцитов в тонком кишечнике [24].

Микробные метаболиты и метаболизм углеводов

У пациентов с диабетом 2 типа в кишечном микробиоме обнаружен повышенный уровень имидазол-5-пропионовой кислоты (ИПК). Она наиболее активно синтезируется в кишечных микробиомах *Bacteroides 2* энтеротипа, отличающихся высоким содержанием грамтрицательных анаэробных палочек и низким содержанием грамположительной анаэроб-

ной микрофлоры. ИПК ингибирует пути передачи сигнала инсулину, тем самым способствует развитию инсулинорезистентности и диабета 2 типа. Ингибирование синтеза ИПК могло бы стать целью терапевтического воздействия, позволившего бы ослабить нежелательные последствия микробной активности [25].

Исследована регуляторная активность производных индола, в синтезе которых участвует кишечная микробиота. Они попадают в системный кровоток и подавляют работу микроРНК (mir-181), что приводит со временем к развитию инсулинорезистентности [26].

В другом исследовании было показано, что ацетат микробного происхождения активизирует парасимпатическую нервную систему, стимулируя таким образом синтез инсулина клетками поджелудочной железы [27]. Пропионовая кислота, напротив, стимулирует симпатическую нервную систему, выделение глюкагона, развитие инсулинорезистентности и других метаболических нарушений [28].

Примеры воздействия кишечной микробиоты на нейроэндокринную регуляцию далеко не единственные. Очевидно, что длительное эволюционирование микробиоты и организма человека привело к возникновению сложных нейроэндокринных механизмов поддержания гомеостаза уровня глюкозы в крови, в которых участвуют и микробные метаболиты. Их вовлеченность в нейроэндокринную регуляцию позволяет предполагать возможность внешнего воздействия с терапевтической целью.

Триметиламиноксид как биомаркер микробного происхождения

Важным направлением изучения метаболической активности кишечного микробиома является поиск микробных метаболитов, которые можно было бы использовать в качестве биомаркеров физиологического состояния человека, а также для оценки риска развития той или иной патологии или стадий прогрессирующего заболевания. Одним из претендентов на роль такого биомаркера является триметиламиноксид (ТМАО) [29]. ТМАО – органическое вещество из группы оксиды аминов (общая формула R_3N-O , где R-углеводородный радикал). Вещество обладает высокой гидрофильностью и участвует в структурной стабилизации белков и нуклеиновых кислот. ТМАО является продуктом окисления триметиламина (ТМА), который в свою очередь является производным холина. В организм человека холин или фосфатидилхолин поступают с пищей (в основном животного происхождения) и подвергаются микробной трансформации в толстой кишке. Среди прочих продуктов микробной транс-

формации образуется и ТМА. Среди бактерий, принимающих непосредственное участие в синтезе ТМА, обнаружены представители таких родов, как *Clostridia*, *Proteus*, *Shigella* и *Aerobacter* [29]. Недавно выяснилось, что круг ТМА-продуцирующих бактерий значительно шире, и было бы более правомерно говорить о дисбиотических нарушениях, которые могут приводить к росту уровня ТМА за счет его сверхпродукции кишечной микробиотой [30].

ТМА окисляется в клетках печени флавиносодержащими монооксигеназами 3 типа до ТМАО. В дальнейшем экскреция ТМАО может происходить с помощью почек (до 95 %), через потоотделение, с фекалиями. Часть ТМАО трансформируется микробами-метаногенами в толстой кишке [31]. Повышение уровня ТМАО в крови мышей после избыточного поступления фосфатидилхолина, холина, карнитина и бетаина с пищей приводило к активации макрофагов и синтезу провоспалительных медиаторов, повышению уровня холестерина и усилению образования атеросклеротических бляшек в стенках сосудов. Прием антибиотиков, подавляющих активность кишечной микрофлоры, приводил к снижению уровня ТМАО в плазме крови и торможению негативных процессов [32].

Изучается возможность регулирования содержания ТМА с помощью диеты. Благотворное влияние диеты, богатой растительными волокнами, уже давно является общепризнанным. Показано, что умеренное потребление мясных продуктов и обильное поглощение растительной пищи приводит к снижению уровня ТМАО в плазме испытуемых пациентов [33]. Однако сведения о влиянии диеты нередко носят неоднозначный характер. В частности, было показано, что средиземноморская диета не столько снижает уровень ТМАО, сколько «нейтрализующе» действует на провоспалительный эффект этого медиатора [33].

Относительно прогностических возможностей ТМАО существует обширная литература. Многоцентровое исследование, проведенное с 13425 пациентами с острой сердечной недостаточностью, показало высокую прогностическую ценность показателя уровня ТМАО для оценки тяжести состояния и возможно результата лечения [34].

Однако в настоящее время все еще присутствует настороженное отношение к данному показателю, поскольку ТМАО зависит от многих факторов, например, от генетического базиса, гормонального фона, диеты и т.д.

Также трудности с поиском идеальных «универсальных» биомаркеров связаны с принципиальной методологической ошибкой. Из-за сложности и раз-

нонаправленности систем регуляции метаболических процессов, единичные биомаркеры не способны обладать универсальной прогностической ценностью. Многие исследователи полагают, что необходимо продолжать поиски дополнительных биомаркеров, которые бы повысили прогностическую ценность уровня ТМАО для оценки риска прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний (особенно атеросклероза), онкозаболеваний, болезни Альцгеймера и т.д. [35]. Многофакторный анализ показывает, что чем больше биомаркеров удастся вовлечь в анализ, тем точнее результаты прогнозирования [35].

Метаболическое «дактилоскопирование»

Как было сказано выше, для целей диагностики и прогнозирования течения заболеваний единичных биомаркеров недостаточно. Очевидно, что множественное нецелевое профилирование (не поиск заданных метаболитов, а исследование множества метаболитов и поиск значимых различий среди целого спектра метаболитов), а также грамотный статистический анализ могут дать более правдивую картину состояния организма. В перспективе возможно создание своеобразного «метаболического паспорта» для оценки рисков развития того или иного заболевания [36].

В настоящее время метаболическое профилирование в силу его продолжительности невозможно использовать в urgentных ситуациях. В исследовательских целях, однако, уже сейчас его применяют в тех случаях, когда длительность исследования не является критическим фактором, например, при диагностике хронических патологий, редких заболеваний, ряда онкозаболеваний [36].

Микробные метаболиты и лекарственные препараты

Широко цитируемое исследование, посвященное воздействию 1000 лечебных препаратов разных классов, показало, что любой из этих препаратов обладает ингибирующим (антибиотикоподобным) действием хотя бы на одну из 40 тестируемых культур [37]. И если цитостатики ожидаемо вели себя агрессивно по отношению к микробным клеткам, то значительный эффект, обнаруженный при тестировании психотропных препаратов, был весьма неожиданным.

Воздействие лекарственных препаратов на микробиом может быть прямым и косвенным. Прямой эффект состоит в частичной или полной трансформации лечебных препаратов микробными ферментами в более или менее активные метаболиты, что приводит к искажению предполагаемых результатов [37, 38].

Непрямое взаимодействие лекарств и кишечного микробиома состоит в конкуренции вводимых препаратов с микробными метаболитами за ферменты, синтезируемые клетками человека, необходимые для трансформации фармпрепарата в целевые метаболиты, которые и оказывают лечебный эффект. Микробные метаболиты могут «модифицировать» работу иммунной системы, что также искажает ожидаемый результат лечения [37, 38].

Проводимые в настоящее время исследования позволяют работать только с упрощенными версиями микробных сообществ (число видов ограничено и не сохраняется структурное соответствие). Кроме того, выявляются только устойчивые метаболиты, которые достаточно долго циркулируют в системном кровотоке. Но даже несмотря на все оговорки, уже имеющиеся в распоряжении исследователей данные свидетельствуют о чрезвычайно активном взаимодействии кишечного микробиома с любыми ксенобиотиками, попадающими в кишечник [39, 40].

Эти исследования дают основания полагать, что при разработке новых пероральных форм лекарственных препаратов в будущем очень важно оценивать эффективность лекарств с точки зрения их взаимодействия с микробиомом человека. Эти исследования могли бы объяснить причину непредсказуемых реакций организма человека на широко назначаемые препараты. Возможно, добавление в лечебную схему специально подобранных пробиотиков могло бы помочь в решении задачи оптимизации клинической эффективности ряда фармацевтических препаратов.

Заключение

В настоящее время представление о безусловном влиянии кишечного микробиома и его метаболитов на все системы и органы человека имеет под собой реальную доказательную базу. Накоплены свидетельства тесного взаимодействия микробных метаболитов, образующихся в кишечнике, а затем попадающих в системный кровоток человека, с углеводным, липидным метаболизмом, а также с центральным конструктивным и энергетическим метаболизмом человека.

Наиболее изученными участниками этих взаимодействий в настоящее время являются короткоцепочечные жирные кислоты и продукты метаболизма ароматических аминокислот, синтез которых осуществляется как строгими анаэробами, так и факультативно-анаэробными обитателями кишечника человека. Обнаружено, что производные короткоцепочечных жирных кислот являются действенными участниками нейроэндокринных взаимодействий. Ки-

шечный метаболом также вовлечен в активный синтез и модификацию пула вторичных желчных кислот.

Результаты исследований взаимодействия организма человека с собственной микрофлорой заставляют по-новому взглянуть на патогенетические механизмы многих заболеваний, изменить подходы к профилактике, пересмотреть стандартные схемы диагностики патологий, в основе которых лежат метаболические нарушения. В настоящее время ведется поиск микробных метаболитов для применения их в качестве биомаркеров или сигнальных метаболитов, по которым можно было бы уточнять диагноз или стадии заболевания. Эти метаболиты должны циркулировать в системном кровотоке достаточно долго и быть ассоциированы с конкретными патофизиологическими состояниями.

Весьма актуальной была и остается проблема профилактики и лечения метаболических нарушений, которые в последние десятилетия во всех развитых странах приобрели характер эпидемии. Возможность разработки препаратов на основе микробных метаболитов для коррекции метаболических нарушений многими исследователями представляется вполне реальной. Уже сейчас производятся ферментные препараты микробного происхождения, которые применяют для снижения уровня холестерина. Кажется интригующей возможность регулировать пищевое поведение человека и его энергетический метаболизм путем коррекции микробиома кишечника с помощью микробных метаболитов, обладающих нейроэндокринной активностью.

Накоплен обширный материал, дающий возможность на основе микробиомных и метаболомных исследований обозначить принципиальные методологические подходы и приступить к разработке новых препаратов для профилактики и лечения широкого спектра патологических состояний организма человека. Поиск новых лечебных подходов должен исходить не только из универсальности базовых механизмов, но и учитывать особенности конкретного организма. Этот тезис сторонников персонифицированной медицины нашел убедительную поддержку в результатах исследования метаболома кишечника человека.

Анализ литературных данных показывает чрезвычайно высокую вариабельность и динамичность функциональных характеристик микробиомов. Эти результаты открывают реальные перспективы для разработки лекарственных препаратов, при создании которых учитывались бы возможности эндогенной микробной трансформации и конкуренции с микробными метаболитами за ферментативные системы организма человека. Немалый потенциал несут в себе и уже давно ставшие привычными пробиотические препараты на

основе живых культур «полезных» микроорганизмов. В настоящее время встал вопрос о разработке новых сложных синбиотиков (сочетание культур микроорганизмов и их ростовых субстратов), способных скорректировать метаболическую активность микробиома кишечника у каждого конкретного человека.

Работы в области метаболомики все еще носят исследовательский и поисковый характер. Однако происходит постоянное накопление экспериментальных данных (прямых или косвенных), в том числе и в экспериментах на модельных животных, которые постепенно приоткрывают завесу над тем, что раньше казалось неизведанной бездной.

Литература/References

- Ceglarek U., Leichtle A., Brügel M., Kortz L., Brauer R., Bresler K., et al. Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 25; 301(1-2): 266-71. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.013>
- Gibbs R.A. The human genome project changed everything. *Nat Rev Genet.* 2020; 21(10): 575-6. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0275-3>
- Wishart D.S., Guo A., Oler E., Wang F., Anjum A., Peters H., et al. HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022; 7; 50(1): 622-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>
- Le Gouellec A., Plazy C., Toussaint B. What clinical metabolomics will bring to the medicine of tomorrow. *Front. Anal. Sci.* 2023; 3: 1142606. <https://doi.org/10.3389/frans.2023.1142606>
- Alseekh S., Aharoni A., Brotman Y., Contrepolis K., D'Auria J., Ewald J., et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods.* 2021; 18(7): 747-56. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>
- Cox T.O., Lundgren P., Nath K., Thaiss C.A. Metabolic control by the microbiome. *Genome Med.* 2022; 14(1): 80. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01092-0>
- Yan S., Wang H., Feng B., Ye L., Chen A. Causal relationship between gut microbiota and diabetic nephropathy: a two-sample mendelian randomization study. *Front Immunol.* 2024; 15: 1332757. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1332757>
- Jiang Y., Pang S., Liu X., Wang L., Liu Y. The gut microbiome affects atherosclerosis by regulating reverse cholesterol transport. *J Cardiovasc Transl Res.* 2024; 17: 624-37. <https://doi.org/10.1007/s12265-024-10480-3>
- Khan M.T., Nieuwdorp M., Backhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2014; 20(5): 753-60. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.006>
- Fluhr L., Mor U., Kolodziejczyk A.A., Dori-Bachash M., Leshem A., Itav S., et al. Gut microbiota modulates weight gain in mice after discontinued smoke exposure. *Nature.* 2021; 600(7890): 713-9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04194-8>
- Breton J., Tennoune N., Lucas N., Francois M., Legrand R., Jacquemot J., et al. Gut commensal *E. coli* proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth. *Cell Metab.* 2016; 23(2): 324-34. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.017>
- Becher T., Palanisamy S., Kramer D.J., Eljalby M., Marx S.J., Wibmer A.G., et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nat Med.* 2021; 27(1): 58-65. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1126-7>
- Agrawal L., Korkutata M., Vimal S.K., Yadav M.K., Bhattacharyya S., Shiga T. Therapeutic potential of serotonin 4 receptor for chronic depression and its associated comorbidity in the gut. *Neuropharmacology.* 2020; 166: 107969. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107969>
- Bhattarai Y., Williams B.B., Battaglioli E.J., Whitaker W.R., Till L., Grover M., et al. Gut microbiota-produced tryptamine activates an epithelial G-Protein-Coupled receptor to increase colonic secretion. *Cell Host Microbe.* 2018; 23(6): 775-85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.004>
- Agus A., Planchais J., Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe.* 2018; 23(6): 716-24. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- Dodd D., Spitzer M.H., Van Treuren W., Merrill B.D., Hryckowian A.J., Higginbottom S.K., et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature.* 2017; 551(7682): 648-52. <https://doi.org/10.1038/nature24661>
- Leitão-Gonçalves R., Carvalho-Santos Z., Francisco A.P., Fioreze G.T., Anjos M., Baltazar C., et al. Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS Biol.* 2017; 15(4): e2000862. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000862>
- Martinez-Guryn K., Hubert N., Frazier K., Urlass S., Musch M.W., Ojeda P., et al. Small intestine microbiota regulate host digestive and absorptive adaptive responses to dietary lipids. *Cell Host Microbe.* 2018; 23(4): 458-69. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.011>
- Araújo J.R., Tazi A., Buren-Defranoux O., Vichier-Guerre S., Nigro G., Licandro H., et al. Fermentation products of commensal bacteria alter enterocyte lipid metabolism. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(3): 358-75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.028>
- Kenny D.J., Plichta D.R., Shungin D., Koppel N., Hall A.B., Fu B., et al. Cholesterol metabolism by uncultured human gut bacteria influences host cholesterol level. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(2): 245-57. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.013>
- Du Toit, A. Reducing cholesterol levels. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18(9): 476. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0410-3>
- Long S.L., Gahan C.G.M., Joyce S.A. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2017; 56: 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.002>
- Guzior D.V., Quinn R.A. Review: microbial transformations of human bile acids. *Microbiome.* 2021; 9(1): 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01101-1>
- Chun E., Lavoie S., Fonseca-Pereira D., Bae S., Michaud M., Hoveyda H.R., et al. Metabolite-sensing receptor Ffar2 regulates colonic group 3 innate lymphoid cells and gut immunity. *Immunity.* 2019; 51(5): 871-84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.014>
- Molinaro A., Bel Lassen P., Henricsson M., Wu H., Adriouch S., Belda E., et al. Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 5881. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19589-w>
- Virtue A.T., McCright S.J., Wright J.M., Jimenez M.T., Mowle W.K., et al. The gut microbiota regulates white adipose tissue inflammation and obesity via a family of microRNAs. *Sci Transl*

- Med.* 2019; 11(496): eaav1892. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav1892>
27. Perry R.J., Peng L., Barry N.A., Cline G.W., Zhang D., Cardone R.L., et al. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature.* 2016; 534(7606): 213-7. <https://doi.org/10.1038/nature18309>
 28. Tirosh A., Calay E.S., Tuncman G., Claiborn K.C., Inouye K.E., Eguchi K., et al. The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Sci Transl Med.* 2019; 11(489): eaav0120. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav0120>
 29. Subramaniam S., Fletcher C. Trimethylamine N-oxide: breathe new life. *Br J Pharmacol.* 2018; 175(8): 1344-53. <https://doi.org/10.1111/bph.13959>
 30. Zhang Y., Wang Y., Ke B., Du J. TMAO: How gut microbiota contributes to heart failure. *Transl Res.* 2021; 228: 109-25. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.08.007>
 31. Gessner A., di Giuseppe R., Koch K., Fromm M.F., Lieb W., Maas R. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) determined by LC-MS/MS: distribution and correlates in the population-based PopGen cohort. *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58(5): 733-40. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1146>
 32. Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S., Dugar B., et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011; 472(7341): 57-63. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
 33. Griffin L.E., Djuric Z., Angiletta C.J., Mitchell C.M., Baugh M.E., Davy K.P., et al. A Mediterranean diet does not alter plasma trimethylamine N-oxide concentrations in healthy adults at risk for colon cancer. *Food Funct.* 2019; 10(4): 2138-47. <https://doi.org/10.1039/c9fo00333a>
 34. Li X., Fan Z., Cui J., Li D., Lu J., Cui X., et al. Trimethylamine N-Oxide in heart Failure: a meta-analysis of prognostic value. *Front Cardiovasc Med.* 2022; 9: 817396. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.817396>
 35. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J.* 2021; 42(25): 2439-54. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab309>
 36. Le Gouellec A., Plazy C., Toussaint B. What clinical metabolomics will bring to the medicine of tomorrow. *Front. Anal. Sci.* 2023; 3: 1142606. <https://doi.org/10.3389/frans.2023.1142606>
 37. Maier L., Pruteanu M., Kuhn M., Zeller G., Telzerow A., Anderson E.E., et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature.* 2018; 555(7698): 623-8. <https://doi.org/10.1038/nature25979>
 38. Javdan B., Lopez J.G., Chankhamjon P., Lee Y.J., Hull R., Wu Q., et al. Personalized mapping of drug metabolism by the human gut microbiome. *Cell.* 2020; 181(7): 1661-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.001>
 39. Guan H., Pu Y., Liu C., Lou T., Tan S., Kong M., et al. Comparison of fecal collection methods on variation in gut metagenomics and untargeted metabolomics. *mSphere.* 2021; 6(5): 636-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00636-21>
 40. Rachmühl C., Lacroix C., Giorgetti A., Stoffel N.U., Zimmermann M.B., Brittenham G.M., et al. Validation of a batch cultivation protocol for fecal microbiota of Kenyan infants. *BMC Microbiol.* 2023; 23(1): 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02915-9>

Сведения об авторах:

Евдокимова Наталья Витальевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ;

Черенькая Татьяна Витальевна, канд. мед. наук, зав. лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ.

© Коллектив авторов, 2025

УДК 616-092.11

Макеев Н.В., Миронов И.В., Антонов М.А., Руденко Д.С.**Клиническая эффективность полипептидного препарата Кортексин в терапии дисциркуляторных и посттравматических нарушений**

ФГБВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6, лит. Ж

Патологическая реструктуризация головного мозга является одним из наиболее угрожающих полноценному образу жизни человека фактором риска ввиду нарушения регуляции иных систем организма и прямого влияния на мыслительные, психосоматические и аналитические функции. Принимая во внимание особый риск поражения ЦНС как для биологической, так и для социальной жизнедеятельности пациента, многие отечественные и зарубежные специалисты ищут новые возможности усовершенствования как медикаментозной, так и хирургической коррекции церебральных нарушений. В обзоре приведены основные исследования, убедительно свидетельствующие об эффективности включения полипептидного препарата Кортексин в комплексную терапию посттравматических и дисциркуляторных расстройств с целью регенерации и улучшения перфузии мозговой ткани, восстановления когнитивных навыков пациентов. Проведен анализ наиболее актуальных работ по клиническому применению Кортексина, сформулирован вывод о составе доказательной базы для повсеместного использования пептидного препарата в различных сферах медицины.

Ключевые слова: ишемия мозга; когнитивные навыки; Кортексин; пептидные препараты; посттравматические нарушения

Для цитирования: Макеев Н.В., Миронов И.В., Антонов М.А., Руденко Д.С. Клиническая эффективность полипептидного препарата Кортексин в терапии дисциркуляторных и посттравматических нарушений. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2025; 69(1): 111–116.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.111-116

Участие авторов: концепция и дизайн исследования — Макеев Н.В., Руденко Д.С.; сбор и обработка материала — Антонов М.А.; статистическая обработка — Миронов И.В., Руденко Д.С.; написание текста — Макеев Н.В., Антонов М.А., Руденко Д.С., Миронов И.В.; редактирование — Макеев Н.В. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Для корреспонденции: Руденко Данил Сергеевич, e-mail: ppH.science@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.11.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Makeev N.V., Mironov I.V., Antonov M.A., Rudenko D.S.**Clinical efficacy of the polypeptide drug Cortexin in the treatment of circulatory and post-traumatic disorders**

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

Pathological brain remodeling is one of the most dangerous risk factors that threatens a person's full-quality life due to the dysregulation of other body systems and direct impact on thinking, psychosomatic and analytical functions. Taking into account the special risk of central lesions for both biological and social activities of the patient, many Russian and international specialists are looking for new opportunities to improve both medical and surgical correction for cerebral disorders. This review summarizes major studies that convincingly demonstrated the effectiveness of including the polypeptide drug Cortexin into the complex therapy of post-traumatic and circulatory disorders to regenerate and improve cerebral tissue perfusion and restore cognitive skills of patients. The analysis of clinical studies of Cortexin revealed the composition of the evidence base for the extensive use of this peptide drug in various fields of medicine.

Keywords: cerebral ischemia; cognitive skills; Cortexin; peptide drugs; post-traumatic disorders

For citation: Makeev N.V., Mironov I.V., Antonov M.A., Rudenko D.S. Clinical efficacy of the polypeptide drug Cortexin in the treatment of circulatory and post-traumatic disorders. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 111–116. (in Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.111-116

Author's contribution: research concept and design – Makeev N.V., Rudenko D.S.; collection and processing of material – Antonov M.A.; statistical processing – Mironov I.V., Rudenko D.S.; writing the text – Makeev N.V., Antonov M.A., Rudenko D.S., Mironov I.V.; editing the text – Makeev N.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Danil S. Rudenko**, cadet of the 2nd Faculty of Medical Training for Missile, Land and Airborne Troops, e-mail: ppH.science@yandex.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 14.11.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Актуальность

Достижения мировой и отечественной фармакологии за последние десятилетия позволили регулировать процессы жизнедеятельности на молекулярном уровне [1]. Возможность выделять макроэргические соединения из органов и тканей животных определило дальнейший вектор развития исследований в области фармакодинамики – минимизация нежелательных последствий в ходе взаимодействия средства с субстратами человеческого организма и развитие максимальной эффективности лекарственной терапии [2]. Особняком стоят исследования, изучающие возможность коррекции неврологического дефицита пациентов с нарушением функций ЦНС вне зависимости от причин их возникновения [3]. Одним из наиболее перспективных средств в данном направлении представляется Кортексин, который является полипептидным препаратом, разработанный в конце XX века ФГБВОУ «ВМА им. С.М. Кирова» [4]. Многие независимые друг от друга исследования Кортексина продемонстрировали целесообразность использования пептидной терапии в коррекции неврологического дефицита пациентов с энцефалопатиями различной этиологии. Доказано, что препарат имеет несколько точек приложения в ЦНС: Кортексин ингибирует ферменты протеолиза и возбуждающие нейромедиаторы [5]; высвобождает NO и стимулирует синтез глутатион-пероксидазы и супероксиддисмутазы [6]; обладает перmissive эффектом в отношении центральных дофаминовых и ацетилхолиновых рецепторов; способствует выделению ГАМК и активирует процессы спраутинга и реструктуризации нейронов [7]. Наиболее примечательным свойством Кортексина признается его влияние на стабилизацию потенциала действия нейронов головного мозга. Подтверждено непосредственное участие пептидного препарата в улучшении работы Na-K-АТФазы, снижении произвольного выброса ионов Ca^{2+} нейронами и регуляции длительности потенциала покоя, что позволяет судить о позитивном эффекте Кортексина на электрофизиологическую активность ЦНС и энергетический запрос [8]. Выявленные антигипоксические, ноот-

ропные и психостимулирующие свойства препарата открыли дальнейшие перспективы для клинических испытаний пептидной терапии в различных областях медицины, начиная с органических поражений ЦНС вплоть до профилактики ишемии головного мозга [9]. **Цель:** установить основные перспективные направления клинического применения Кортексина в коррекции посттравматических и дисциркуляторных патологических состояний ЦНС, обосновать необходимость включения Кортексина в комплексную терапию типовых церебральных нарушений.

Методика

Проведен анализ авторитетных клинических исследований Кортексина начиная с 2000 г., корреляции действия пептидной терапии и диагностических показателей пациентов с патологическими изменениями ЦНС различной этиологии. Поиск результатов публикаций осуществлялся с помощью поисковой системы Google Scholar и сетевого ресурса ООО «Научная электронная библиотека» (elibrary.ru). В первичную оценку были включены 194 работы, содержащие информацию о применении Кортексина в лечении посттравматических и дисциркуляторных расстройств головного мозга. Для систематического анализа отобрано 7 наиболее актуальных клинических исследований, в которых представлены сведения о возможностях применения полипептидной терапии при коррекции типовых патологических состояний ЦНС за 2018-2023 гг. Выделены патологические состояния, в коррекции которых эффективность Кортексина была максимально аргументирована, поставлены вопросы о свойствах препарата, имеющих недостаточную доказательную базу.

Результаты

На основании изучения работ по практическому применению Кортексина у пациентов с поражениями ЦНС, сопровождающимися выраженными когнитивными нарушениями и отклонением психоэмоционального статуса были выделены следующие наиболее изученные сферы использования пептидной терапии:

восстановление после ишемического инсульта, черепно-мозговых травм легкой и средней тяжести, дисциркуляторных энцефалопатий; лечение эпилепсии; коррекция нарушений речи и психомоторных функций различного генеза (в особенности, в педиатрии и геронтологии); поражения зрительного нерва [10].

Обоснование потенциалорегулирующей активности головного мозга при ишемических и прямых поражениях получено диагностическими методами: В.Н. Цыган и др. доказали положительную ЭЭГ-динамику у лиц, перенесших инсульт или черепно-мозговую травму, на форме приема Кортексина (52,4% пациентов с практически полным восстановлением электрофизиологической активности головного, мозга (II тип), достоверное ($p < 0,05$) восстановление быстроволновой активности у лиц с острой ЧМТ) [11]. Подтверждена позитивная корреляция применения Кортексина и показателей фМРТ: данные работы М.М. Танашьяна показывают снижение первичных зон активации в лобных долях у пациентов с цереброваскулярными нарушениями ($p < 0,05$) [12]. Подробно изучено непосредственное влияние Кортексина на интракраниальную гемодинамику: подтверждены стимулирующие эффекты пептидной терапии при дисбалансе ликворопродукции (повышение индекса рестрикции задней черепной ямки на 3% ($p < 0,05$) у пациентов с легкой ЧМТ после года лечения в работе Т.А. Прокаевой) [13]; повышение объемной скорости кровотока после перенесенной ишемии ($p < 0,05$; в работе А.В. Арльт) [14].

Приведенные выше результаты диагностических исследований фундаментально аргументируют целесообразность использования Кортексина в лечении потенциалопроводящих, трофических и циркуляторных осложнений патологии ЦНС вне зависимости от причины повреждений. Многочисленные клинические обследования показывают эффективность Кортексина, в первую очередь, в коррекции посттравматических когнитивных нарушений у пациентов, как правило, сопровождающих повреждение мозговой ткани. На основании клинического обследования лиц с нейропатиями, осложненными психофункциональными расстройствами отмечались следующие положительные эффекты применения пептидной терапии: улучшение общего состояния пациентов; восстановление когнитивных и эмотивных функций; стабилизация фаз сна; повышение умственных навыков и т.д. (повышение уровня работоспособности и уменьшения усталости у 39% пациентов ($p < 0,05$) в исследовании В. Н. Цыгана [15]; улучшения когнитивных навыков среди детей с ДЦП на 7,1% против базисной терапии ($p < 0,05$) в работе Е.В. Колесниковой [16]).

Обозначены перспективные направления включения Кортексина в комплексную терапию сосудистой деменции и болезни Альцгеймера, в настоящий момент не имеющие достаточно сформированной доказательной базы [17]. При анализе данных исследований клинического применения Кортексина в коррекции посттравматических и постишемических состояний за последние 5 лет, выявлены положительные свойства препарата, подтвержденные многочисленными результатами исследований, начиная с конца XX века.

Согласно данным клинических исследований Кортексина за последние десять лет препарат демонстрирует высокую эффективность в области коррекции травматических и дисциркуляторных патологических изменений ЦНС (см. табл.). Среди наиболее значимых показателей, отображающих преимущество пептидной терапии над базисным лечением, авторы выделяют восстановление альфа-ритма ЭЭГ головного мозга ($p < 0,05$ в работе О.Е. Гурской; $p < 0,01$ в работе О.Ю. Суменко) и результаты оценки психического статуса по шкале MMSE ($p < 0,05$ в работе М.А. Евзельман, $p < 0,01$ в работе Д.Ш. Юлдашевой). Несмотря на доказанное нейротрофическое действие Кортексина, отсутствие актуальных клинических исследований показателей мозгового кровотока при лечении пептидами не позволяет достоверно судить о воздействии препарата на сосудистый компонент энергетического обеспечения ЦНС.

Учитывая разнонаправленность действия Кортексина в области клеточных и молекулярных нарушений пластического и энергетического обмена, осложняющихся, в первую очередь, у лиц с пониженной резистентностью к патогенным факторам внешней среды и склонностью к сдвигу гомеостаза в совокупности с отсутствием выявленных нежелательных последствий применения препарата, наиболее клинически эффективной и практикуемой областью использования пептидной терапии в настоящее время является геронтология. Геропротективная эффективность Кортексина находит клинические подтверждения с начала 2000 г.: в комплексной работе Г.А. Рыжак по обследованию пациентов пожилого возраста с органическими нарушениями структуры ЦНС различной этиологии, прошедших курс пептидной терапии, отмечали полное восстановление продуктивной умственной деятельности у больных с неврозоподобной симптоматикой [24]. Особое внимание исследователи обращают на показатели ЭЭГ: после прохождения курса лечения Кортексином наблюдается увеличение активности α -ритма в 1,43 раза по сравнению с показателями контрольной группы [25]. Актуальным вопросом современной геронтологии является

Особенности клинических исследований терапевтического эффекта Кортиксина при нарушениях ЦНС травматического и дисциркуляторного генеза в 2018-2023 гг.

Features of clinical studies of the therapeutic effect of Cortixin in diseases of the central nervous system of traumatic and vascular origin in 2018-2023.

Автор	Контроль	Группа исследуемых	Длительность лечения; дозы	Используемые методы	Результат	№
О.Е. Гурская и др. 2018	Базисная терапия	ДЭ I-II ст. 150 чел.	10 дней; 10 мг/сут	ЭЭГ (К α/θ покоя)	Положит. (p<0,05)	[18]
О.Ю. Суменко и др. 2020	Базисная терапия	ЧМТ 74 чел. (дети)	10 дней (2 курса); 10 мг/сут	КТ; ЭЭГ; Проба Шульце	Положит. (p<0,001)	[19]
В.В. Синявский 2020	Базисная терапия	ЧМТ; Посттравм. Эпилепсия; 71 чел.	10 дней (2 курс/3 мес); 10 мг/сут	WCST; Тест Ровена и др.	Положит. (p<0,05)	[6]
Д.Ш. Юлдашева и др. 2020	Плацебо	ИМ; 74 чел.	3 месяца; От 100-200 мг	CDT; MMSE и др.	Положит. (p≤0,001)	[20]
М.А. Евзельман 2020	Базисная терапия	ХИГМ; 60 чел.	10 дней (4 курса/год); 20 мг/сут	MMSE; шкала Моса	Положит. (p<0,05)	[21]
Ф.А. Хабилов И др. 2020	Целлекс	ИМ; 60 чел.	10 дней; 10 мг/сут	MMSE; NIHSS	Незнач.	[22]
И.М. Бальхаев и др. 2023	Базисная терапия	Ишемич. инсульт; 60 чел.	10 дней; 10 мг/сут	ARAT; FIM	Положит. (p<0,05)	[23]

Примечание. ДЭ-дисциркуляторная энцефалопатия; ЧМТ – черепно-мозговая травма; ХИГМ – хроническая ишемия головного мозга; ИМ-ишемия мозга; ЭЭГ-электроэнцефалография; КТ-компьютерная томография; WCST-Висконсинский тест сортировки карт; CDT-тест рисования часов; MMSE – краткая шкала оценки психического статуса; NIHSS-шкала инсульта Национального института здоровья; ARAT-Action Research Arm test; FIM-Functional Independence Measure. Для проверки нормальности распределения в выборке авторы исследований использовали критерий Шапиро-Уилка. Сравнение количественных показателей в группах осуществляли с применением непараметрических критериев Уилкоксона и Манна-Уитни, проверку значимости различий выполняли по критерию χ² Пирсона. Статистически значимым уровень указанных критериев считался при p<0,05.

Note. DE-dyscirculatory encephalopathy; TBI – traumatic brain injury; HIGM – chronic cerebral ischemia; IM-brain ischemia; EEG-electroencephalography; CT-computed tomography; WCST-Wisconsin card sorting test; CDT-clock drawing test; MMSE – short scale for assessing mental status; NIHSS-stroke scale of the National Institute of health; ARAT-Action Research Arm test; FIM-Functional Independence Measure. To check the normality of the distribution in the sample, the authors of the research used the Shapiro-Wilk criterion. The quantitative indicators in the groups were compared using the nonparametric Wilcoxon and Mann-Whitney criteria, and the significance of the differences was checked using Pearson’s χ² criterion. The level of these criteria was considered statistically significant at p<0.05.

целесообразность включения Кортиксина в комплексное лечение метаболического синдрома пожилых пациентов, необходимость данного решения обоснована исследованием Е.А. Лысовой, основанным на данных шкалы возрастной жизнеспособности Коннор-Девидсона (10-пунктовая версия) [26].

Выводы

По результатам проведенного анализа литературы показано, что наиболее перспективным направлением является использование Кортиксина в геронтологической терапии посттравматических и дисциркуляторных расстройств ЦНС исходя из нейротрофических, антиоксидантных и гемодинамических свойств препарата, на основании диагностических и субъективных

данных клинической практики. Принимая во внимание результаты последних проспективных работ, посвященных изучению эффективности нейропротекции с использованием пептидных соединений, стоит отметить высокую актуальность применения Кортиксина в базовой терапии нарушений ЦНС травматического и дисциркуляторного генеза.

Литература

1. Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина*. 2020; 98(3): 165-77. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177>
2. Полянский М.А. Основные концепции синтеза пептидов как нового поколения биологически активных препаратов. *Известия Санкт-Петербургского государственного технологическо-*

- го института (технического университета). 2021; 58(84): 62-5. <https://doi.org/10.36807/1998-9849-2021-58-84-62-65>
3. Коротаева Е.О. Ноотропные лекарственные средства пептидной природы, стандартизация и контроль качества. *Актуальные вопросы фармацевтических и естественных наук: Сборник статей Всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием*, Иркутск, 21–26 сентября 2020 года. Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет. 2020; 181-6.
 4. Кошманова А.Н. Перспективы применения Кортексина. *Главврач*. 2022; (7): 21-4. <https://doi.org/10.33920/med-03-2207-05>
 5. Яковлев А.А., Лыжин А.А., Хаспекоев Л.Г., Гехт А.Б., Гуляева Н.В. Пептидный препарат кортексин ингибирует каспазу-8 мозга. *Биомедицинская химия*. 2017; 63(1): 27-31. <https://doi.org/10.18097/PBMC2017630127>
 6. Синявский В.В. Оптимизация методов коррекции и профилактики когнитивных нарушений у пациентов с посттравматической эпилепсией. *Consilium Medicum*. 2020; 22(9): 23-7. <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.9.200316>
 7. Студеникин В.М., Пак Л.А., Турсунхужаева С.Ш., Шелковский В.И. Применение кортексина в неврологии: от перинатальной до геронтологической патологии. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2010; (3): 246-9.
 8. Маменкова, А.С. Нейропротекторная терапия при хронической ишемии головного мозга (обзор литературы). *Бюллетень Северного государственного медицинского университета*. 2021; 1(46): 40-3.
 9. Студеникин В.М., Пак Л.А., Турсунхужаева С.Ш., Шелковский В.И., Нечаева Н.Л. Пептидная нейропротекция в нейрофармакологии детского возраста: от коррекции задержек развития до острых нарушений мозгового кровообращения. *Эффективная фармакотерапия*. 2012; (13): 16-21.
 10. Дьяконов М.М., Шабанов П.Д. К вопросу о нейропротекторном действии пептидных препаратов. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2011; 1(33): 255-8.
 11. Цыган В. Н., Богословский М. М., Миролюбов А. В. *Электроэнцефалография*. под ред. М.М. Дьяконова; Военно-мед. акад. Санкт-Петербург: Наука, 2008.
 12. Танащян М.М., Коновалов Р.Н., Лагода О.В. Новые подходы к коррекции когнитивных нарушений при цереброваскулярных заболеваниях. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2018; 12(3): 30-9. <https://doi.org/10.25692/ACEN.2018.3.4>
 13. Прокаева Т.А., Очирова Е.Б., Борисов Э.Б., Борисова В.Э., Жигаева Г.Ф. Кортексин в профилактике синдрома внутричерепной гипертензии при последствиях закрытой черепно-мозговой травмы. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012; 6(88): 33-5.
 14. Арльт А.В. Влияния кортексина, валсартана, периндоприла и рамиприла на изменения объёмной скорости мозгового кровотока в постишемическом периоде. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2022; 11(125): 64. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.41>
 15. Цыган В.Н. Синдром хронической усталости и его коррекция кортексином. *РМЖ*. 2010; 18(16): 1004-7.
 16. Колесникова Е.В., Стародубцев А.И., Стародубцев А.А. Минаева О.А., Агранович О.В. Опыт применения кортексина для коррекции когнитивных нарушений у детей с ДЦП. *Медицинская профилактика, реабилитация и курортная медицина на рубеже III-го тысячелетия: Сборник статей международной научно-практической конференции, Ставрополь, 12–14 октября 2016 года*. Ставрополь: Ставропольский государственный медицинский университет, 2016; 27-9.
 17. Плавинский С.Л., Шабалкин П.И. Мета-анализ. Церебролизин, Кортексин, Целлекс: эффективность при сосудистой деменции, болезни Альцгеймера и ишемическом инсульте. *Медицина*. 2016; 4(2): 1-15.
 18. Гурская О.Е., Цыган В.Н., Миролюбов А.В. Количественная электрофизиологическая характеристика нейродегенерации при энцефалопатиях различного генеза. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2018; (1): 7-12.
 19. Скрипник О.Ю., Суменко В.В., Трусова О.Ю., Данилова Е.И., Евстифеева Г.Ю., Челпаченко О.Е. Лечение детей с ушибом головного мозга средней степени тяжести в амбулаторных условиях. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(3): 29-33. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012003129>
 20. Юлдашева Д.Ш.К., Джурабекова А.Т., Абдуллаева Н.Н., Гафурова Ж.Ф., Шомуродова Д.С. Терапевтическое влияние на когнитивные функции пациентов в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта. *Достижения науки и образования*. 2020; 3(57): 71-6.
 21. Мусхаджиева А.Ш., Евзельман М.А. Нейропротективная терапия при хронической ишемии головного мозга и когнитивных нарушениях. *Медицинский алфавит*. 2020; (1): 46-7.
 22. Хабиров Ф.А., Хайбуллин Т.И., Гранатов Е.В., Ахметова Г.И., Ахметзянов Н.М. Сравнение эффективности препаратов Целлекс и Кортексин у пациентов в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(12-2): 11-5. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012012211>
 23. Архинчеева Н.Ц., Бальхаев И.М., Касимова В.Н. Метод комплексной реабилитации пациентов в раннем восстановительном периоде инсульта. *Современные проблемы экологии и здоровья населения: Материалы II Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 300-летию Российской академии наук, и V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, Ангарск, 04–07 июля 2023 года*. Иркутск: ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», 2023; 10-16.
 24. Рыжак Г.А., Малинин В.В., Платонова Т.Н. *Кортексин и регуляция функций головного мозга*. под ред. Скоромца А.А., Хавинсона В.Х. СПб.: Фолиант, 2001.
 25. Реутов В.П., Самосудова Н.В., Филиппова Н.А., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Сорокина Е.Г. и др. Кортексин и нитрит в сочетании с кортексином уменьшают отек и разрушение нейронов мозжечка при геморрагическом инсульте. *Доклады Академии наук*. 2009; 426(3): 410-3.
 26. Лысова Е.А. Комплексная когнитивная реабилитация пожилых пациентов с метаболическим синдромом: *специальность 14.01.30 «Геронтология и гериатрия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук*. Лысова Екатерина Александровна, 2021.

References

1. Khavinson V.X. Medicinal peptide preparations: past, present, future. *Klinicheskaya meditsina*. 2020; 98(3): 165-77. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177> (in Russian)
2. Polianskii M.A. Osnovnye kontseptsii sinteza peptidov kak novogo pokolenia biologicheski aktivnykh preparatov. *Izvestiia Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta*

- (*tekhnicheskogo universiteta*). 2021; 58(84): 62-5. <https://doi.org/10.36807/1998-9849-2021-58-84-62-65>. (in Russian)
3. Korotaeva E.O. Nootropic medicines of peptide nature, standardization and quality control. *Aktual'nye voprosy farmatsevticheskikh i estestvennykh nauk: Sbornik statei Vserossiiskoi studencheskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, Irkutsk, 21–26 sentyabrya 2020 goda*. Irkutsk: Irkutskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet, 2020; 181-6. (in Russian)
 4. Koshmanova A.N. Prospects for the use of Cortexin. *Glavvrach*. 2022; (7): 21-4. <https://doi.org/10.33920/med-03-2207-05>. (in Russian)
 5. Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G., Gekht A.B., Gulyaeva N.V. The peptide drug cortexin inhibits brain caspase -8. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2017; 63(1): 27-31. <https://doi.org/10.18097/PBMC2017630127>. (in Russian)
 6. Sinyavsky V.V. Optimization of methods of correction and prevention of cognitive impairment in patients with post-traumatic epilepsy. *Consilium Medicum*. 2020; 22(9): 23-7. <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.9.200316>.
 7. Studenikin V.M., Pak L.A., Tursunkhuzhaeva S.Sh., Shelkovsky V.I. The use of cortexin in neurology: from perinatal to gerontological pathology. *Vestnik Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii*. 2010; (3): 246-9. (in Russian)
 8. Mamenkova, A.S. Neuroprotective therapy in chronic brain ischemia (literature review). *Byulleten' Severnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2021; 1(46): 40-3. (in Russian)
 9. Studenikin V.M., Pak L.A., Tursunkhuzhaeva S.Sh., Shelkovsky V.I., Nechaeva N.L. Peptide neuroprotection in childhood neuropharmacology: from correction of developmental delays to acute cerebral circulatory disorders. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2012; (13): 16-21. (in Russian)
 10. Diakonov M.M., Shabanov P.D. On the neuroprotective effect of peptide drugs. *Vestnik Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii*. 2011; 1(33): 255-8. (in Russian)
 11. Cygan V.N., Bogoslovsky M.M., Mirolyubov A.V. *Electroencephalography. [Elektroentsefalografiya]*, ed. M.M. Diakonova. Military medical academic staff. Saint Petersburg: Nauka Publ., 2008. (in Russian)
 12. Tanashyan M.M., Konovalov R.N., Lagoda O.V. New approaches to correction of cognitive impairments in cerebrovascular diseases. *Annaly klinicheskoi i eksperimental'noi neurologii*. 2018; 12(3): 30-9. <https://doi.org/10.25692/ACEN.2018.3.4> (in Russian)
 13. Prokaeva T.A., Ochirova E.B., Borisov E.B., Borisova V.E., Zhigaev G.F. Cortexin in the prevention of intracranial hypertension syndrome after closed traumatic brain injury. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 6(88): 33-5. (in Russian)
 14. Arlt A.B. Effects of cortexin, valsartan, perindopril, and ramipril on changes in the volume velocity of cerebral blood flow in the post-ischemic period. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal*. 2022; 11(125): 64. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.41> (in Russian)
 15. Cygan V.N. Chronic fatigue syndrome and its correction with cortexin. *RMJ*. 2010; 18(16): 1004-7. (in Russian)
 16. Kolesnikova E.V., Starodubtsev A.I., Starodubtsev A.A., Minaeva O.A., Agranovich O.V. Experience of using cortexin to correct cognitive impairments in children with cerebral palsy. [*Meditsinskaya profilaktika, reabilitatsiya i kurortnaya meditsina na rubezhe III-go tysyacheletiya: Sbornik statei mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, Stavropol', 12–14 oktyabrya 2016 goda*]. Stavropol': Stavropol'skii gosudarstvennyi meditsinskii universitet, 2016; 27-9. (in Russian)
 17. Plavinsky S.L., Shabalkin P.I. Meta-analysis. Cerebrolysin, Cortexin, Cellex: efficacy in vascular dementia, Alzheimer's disease, and ischemic stroke. *Medicina*. 2016; 4(2): 1-15. (in Russian)
 18. Gurskaya O.E., Cygan V.N., Mirolyubov A.V. Quantitative electrophysiological characteristics of neurodegeneration in encephalopathies of various origins. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii*. 2018; (1): 7-12. (in Russian)
 19. Skripnik O.Yu., Sumenko V.V., Trusova O.Yu., Danilova E.I., Evstifeeva G.Yu., Chelpanchenko O.E. Outpatient treatment of children with moderate brain injury. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2020; 120(3): 29-33. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012003129> (in Russian)
 20. Yuldasheva D.Sh.K., Dzhurabekova A.T., Abdullayeva N.N., Gafurova Zh.F., Shomurodova D.S. Therapeutic effect on cognitive functions of patients in the early period of ischemic stroke. *Dostizheniya nauki i obrazovaniya*. 2020; 3(57): 71-6. (in Russian)
 21. Muskhadzhiyeva A.Sh., Evzelman M.A. Neuroprotective therapy in chronic cerebral ischemia and cognitive impairment. *Meditsinskii al'favit*. 2020; (1): 46-7. (in Russian)
 22. Khabirov F.A., Khaibullin T.I., Granatov E.V., Akhmetova G.I., Akhmetzyanov N.M. Comparison of the effectiveness of Cellex and Cortexin drugs in patients in the early recovery period of ischemic stroke. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. C.C. Korsakova*. 2020; 120(12-2): 11-5. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012012211> (in Russian)
 23. Arkhincheeva N.C., Balkhaev I.M., Kasimova V.N. Method of complex rehabilitation of patients in the early recovery period of stroke. [*Sovremennye problemy ekologii i zdorov'ya naseleniya: Materialy II Vserossiiskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoy 300-letiyu Rossiiskoi akademii nauk, i V Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh, Angarsk, 04–07 iyulya 2023 goda*]. Irkutsk: FGBNU "Irkutskii nauchnyi tsentr khirurgii i travmatologii", 2023. 10-16. (in Russian)
 24. Ryzhak G.A., Malinin V.V., Platonova T.N. *Cortexin and regulation of brain functions. [Korteksin i regulyatsii funktsii golovnogo mozga]*, ed. Skoromtsa A.A., Khavinson V.H. SPb.: Foliant, 2001. (in Russian)
 25. Reutov V.P., Samosudova N.V., Filippova N.A., Krushinsky A.L., Kuzenkov V.S., Sorokina E.G., et al. Cortexin and nitrite in combination with cortexin reduce swelling and destruction of cerebellar neurons in hemorrhagic stroke. *Doklady Akademii nauk*. 2009; 426(3): 410-3. (in Russian)
 26. Lysova E.A. Complex cognitive rehabilitation of elderly patients with metabolic syndrome: *spetsial'nost' 14.01.30 "Gerontologiya i geriatriya": dissertatsiya na soiskanie uchenoy stepeni kandidata meditsinskikh nauk. Lysova Ekaterina Aleksandrovna, 2021*. (in Russian)

Сведения об авторах:

Макеев Никита Вячеславович, преподаватель каф. патологической физиологии;

Миронов Илья Васильевич, канд. мед. наук, преподаватель каф. госпитальной терапии;

Антонов Матвей Александрович, курсант 2 факультета подготовки врачей для Ракетных, Сухопутных и Воздушно-десантных войск;

Руденко Данил Сергеевич, курсант 2 факультета подготовки врачей для ракетных, сухопутных и воздушно-десантных войск, e-mail: ppH.science@yandex.ru