

СИБИРСКИЙ ЖУРНАЛ КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

ISSN print 2713-2927
ISSN online 2713-265X



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ РЕЦЕНЗИРУЕМОЕ ИЗДАНИЕ

The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine

SCIENCE AND PRACTICE PEER-REVIEWED JOURNAL

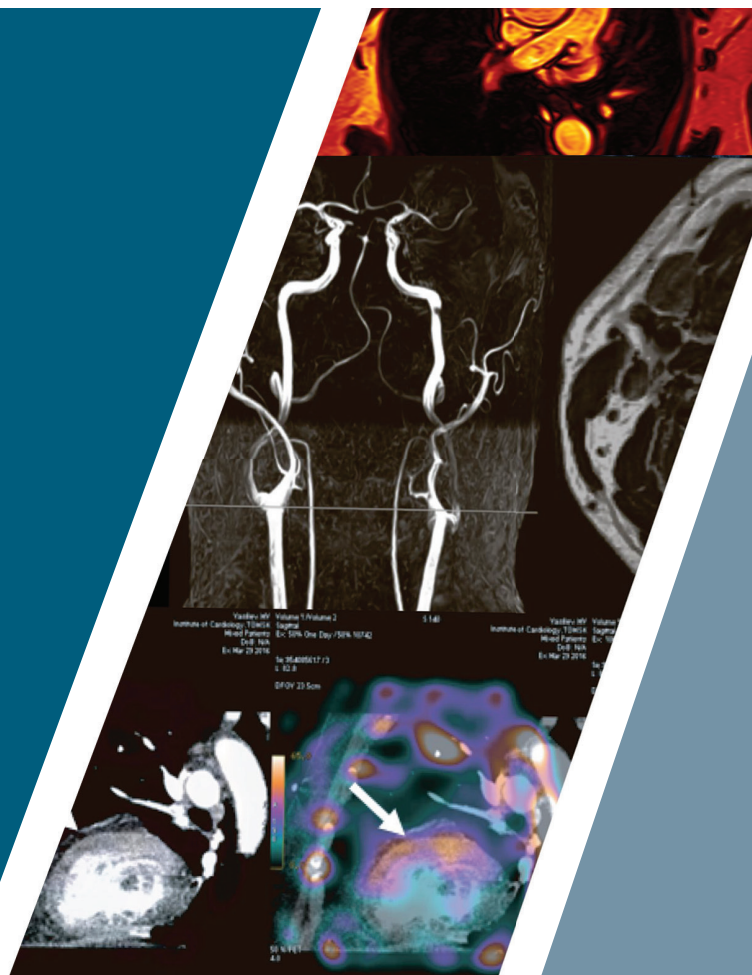
ТЕМА ВЫПУСКА

Проблемы фундаментальной медицины

- Обзоры и лекции
- Клинические исследования
- Экспериментальные исследования
- Организация здравоохранения и общественное здоровье



ТОМСКИЙ НИМЦ
НИИ КАРДИОЛОГИИ



1'2023
Том 38

ISSN print 2713-2927
ISSN online 2713-265X

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук» (Томский НИМЦ)

СИБИРСКИЙ ЖУРНАЛ КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

Журнал выходит ежеквартально с 1996 г.

Том 38, № 1, 2023

Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences

THE SIBERIAN JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

The journal is published from 1996 quarterly

Volume 38, No. 1, 2023



СОДЕРЖАНИЕ CONTENTS

От редакторов выпуска 12 From the editors of the issue

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

REVIEWS AND LECTURES

Галагудза М.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В.
Индукцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень
противовоспалительной терапии: надежда не потеряна?

13 Galagudza M.M., Belsky Y.P., Belsky N.V.
Inducible NO synthase as a pharmacological target of anti-
inflammatory therapy: hope is not lost?

Мордовин В.Ф., Зюбанова И.В., Манукян М.А.,
Доржиева И.К., Вторушина А.А., Хунхинова С.А.,
Фальковская А.Ю.
Роль иммуно-воспалительных механизмов в патогенезе
артериальной гипертензии

21 Mordovin V.F., Zyubanova I.V., Manukyan M.A.,
Dorzheva I.K., Vtorushina A.A., Khunkhinova S.A.,
Falkovskaya A.Yu.
The role of immune-inflammatory mechanisms in the pathogenesis
of hypertension

Белик Е.В., Дылева Ю.А., Груздева О.В.
Церамиды: взаимосвязь с факторами риска
сердечно-сосудистых заболеваний

28 Belik E.V., Dyleva Y.A., Gruzdeva O.V.
Ceramides: correlation with cardiovascular risk factors

Мухомедзянов А.В., Сиротина М.А., Логвинов С.В.,
Нарыжная Н.В.
Дистантное посткондиционирование миокарда: механизмы,
эффективность при метаболическом синдроме
в экспериментальных и клинических исследованиях (обзор)

37 Mukhomedzyanov A.V., Sirotina M.A., Logvinov S.V.,
Naryzhnaya N.V.
Remote postconditioning of myocardium: mechanisms, efficacy in
metabolic syndrome in experimental and clinical studies (review)

Василькова Т.Н., Мищенко Т.А.
Современные методы оценки эпикардиальной
жировой ткани

46 Vasilkova T.N., Mischenko T.A.
Recent assessment methods of epicardial adipose tissue

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

CLINICAL INVESTIGATIONS

Петрова И.В., Трубачева О.А., Бирулина Ю.Г.,
Чумакова С.П., Гусакова С.В.
Роль донора сероводорода в аденозиндифосфат-
индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов
с ишемической болезнью сердца

58 Petrova I.V., Trubacheva O.A., Birulina J.G., Chumakova S.P.,
Gusakova S.V.
The role of the hydrogen sulfide donor in adenosine diphosphate-
induced platelet aggregation in patients with coronary heart disease

Кошельская О.А., Нарыжная Н.В., Кологривова И.В.,
Суслова Т.Е., Кравченко Е.С., Харитоновна О.А., Андреев С.Л.,
Марголис Н.Ю., Шарыпова Н.Г., Крапивина А.С.
Взаимосвязь гипертрофии эпикардиальных адипоцитов
с адипокинами, воспалением и метаболизмом глюкозы
и липидов

64 Koshelskaya O.A., Naryzhnaya N.N., Kologrivova I.V.,
Suslova T.E., Charitonova O.A., Andreev S.L.,
Margolis N.Yu., Sharipova N.G., Krapivina A.S.
Correlation of epicardial adipocytes hypertrophy with adipokines,
inflammation and glucose and lipid metabolism

Васильев А.П., Стрельцова Н.Н.
Изменение колебательных и нелинейно-динамических про-
цессов микроциркуляции у пациентов с облитерирующим атеро-
склерозом артерий нижних конечностей после
реваскуляризации

75 Vasiliev A.P., Streltsova N.N.
Changes in oscillatory and nonlinear dynamic processes of
microcirculation in patients with obliterating atherosclerosis of
lower limb arteries after revascularization

Кондратюк Р.Б., Греков И.С., Швороб Д.С., Селезнёв Е.А.
Морфологические особенности эпителиально-
мезенхимальной трансформации и ее влияние на опухолевую
прогрессию рака молочной железы

82 Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Shvorob D.S., Seleznev E.A.
Morphological features of epithelial-mesenchymal transformation
and its effect on tumor progression of breast cancer

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS

Патологическая физиология

Pathological physiology

Логвинов С.В., Мустафина Л.Р., Курбатов Б.К.,
Сиротина М.А., Горбунов С.А., Нарыжная Н.В.
Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты
на возрастные изменения миокарда у крыс

90 Logvinov S.V., Mustafina L.R., Kurbatov B.K., Sirotina M.A.,
Gorbunov A.S., Naryzhnaya N.V.
Influence of a high-carbohydrate high-fat diet on age-related
changes in the myocardium in rats

Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Воронкова О.В.
Функциональное состояние системы глутатиона в жировой
ткани крыс при метаболическом синдроме

99 Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Voronkova O.V.
Functional state of the glutathione system in the adipose tissue
of rats with metabolic syndrome

Дьякова Е.Ю., Черных А.Е., Милованова К.Г., Чибалин А.В., Капилевич Л.В.

Влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миоцитов в условиях гипергликемии

Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Островик М.О., Попов С.В.

Инотропная реакция миокарда крыс разного возраста на extrasystolic воздействия при постинфарктном кардиосклерозе

Пашковская О.А., Филатова Н.А., Докучаева А.А., Шигаев В.В., Красильников С.Э.

Изучение развития лучевого пневмонита в легких у крыс при ротационном и статическом облучении

Мустафина Л.Р., Логвинов С.В., Богданова Л.И., Курбатов Б.К.

Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на морфологию печени у молодых и старых крыс

Котиева И.М., Францьянц Е.М., Шлык С.В., Дроботья Н.В., Гулян М.В., Додохова М.А.

Анализ изменения коэффициента инактивации серотонина в структурах головного мозга при одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии

Тканевая биоинженерия

Сенокосова Е.А., Резвова М.А., Севостьянова В.В., Матвеева В.Г.

Первые результаты создания гибридного гидрогеля на основе фибрина и поливинилового спирта: сравнение с монокомпонентными гидрогелями

Кривкина Е.О., Миронов А.В., Шабаетов А.Р., Великанова Е.А., Ханова М.Ю., Синицкая А.В., Антонова Л.В., Барбараш Л.С.

Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ.

Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Сенокосова Е.А., Ханова М.Ю., Кривкина Е.О., Антонова Л.В.

Анализ эффективности различных белковых покрытий для оптимизации эндотелизации полимерных матриц

Фармакология

Додохова М.А., Воронова О.В., Котиева И.М., Сафроненко А.В., Шлык С.В., Дроботья Н.В., Акименко М.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р.

Сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений

Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Тюренков И.Н., Озеров А.А., Самотруева М.А.

Оценка противомикробной активности пиримидинового соединения 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хинозаолин-4(3H)-он в отношении *Klebsiella pneumoniae* в условиях *in vivo*

ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ

Чукреев М.П., Калинин Д.Е.

Удовлетворенность качеством амбулаторно-поликлинической помощи студентов-медиков как элемент оценки действующей системы медицинского обслуживания

106 Dyakova E.Y., Chernykh A.E., Milovanova K.G., Chibalin A.V., Kapilevich L.V.

Effect of electrical stimulation on the content of pAkt in myocyte cell culture under hyperglycemia

110 Rebrova T.Yu., Kondratieva D.S., Afanasiev S.A., Ostrovik M.O., Popov S.V.

Myocardial inotropic response of rats of different age to extrasystolic exposures in postinfarction cardiosclerosis

118 Pashkovskaya O.A., Filatova N.A., Dokuchaeva A.A., Shigaev V.V., Krasilnikov S.E.

Study of radiation-induced pneumonitis after arc and static irradiation in lungs of rats

126 Mustafina L.R., Logvinov S.V., Bogdanova L.I., Kurbatov B.K.

Effects of a high-carbohydrate high-fat diet on liver morphology in young and old rats

133 Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Shlyk S.V., Drobotya N.V., Gulyan M.V., Dodokhova M.A.

Analysis of changes in the serotonin inactivation coefficient in brain structures with simultaneous modeling of chronic neurogenic pain and malignant neoplasia

Tissue bioengineering

140 Senokosova E.A., Rezvova M.A., Sevostyanova V.V., Matveeva V.V.

The first results of obtaining a hybrid hydrogel based on fibrin and polyvinyl alcohol: comparison with monocomponent hydrogels

151 Krivkina E.O., Mironov A.V., Shabaev A.R., Velikanova E.A., Khanova M.Yu., Sinitzskaya A.V., Antonova L.V., Barbarash L.S.

Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis

160 Velikanova E.A., Matveeva V.G., Senokosova E.A., Khanova M.U., Krivkina E.O., Antonova L.V.

Analysis of the effectiveness of various protein coatings for optimizing the endothelialization of polymer matrices

Pharmacology

167 Dodokhova M.A., Voronova O.V., Kotieva I.M., Safronenko A.V., Shlyk S.V., Drobotya N.V., Akimenko M.A., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R.

Comparative analysis of morphological and biochemical changes after a single intragastric administration of hybrid organotin compounds

175 Tsbizova A.A., Yasenyavskaya A.L., Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Samotrueva M.A.

Evaluation of the antimicrobial activity of a pyrimidine compound 2-methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl) quinazolin-4(3H)-on against *Klebsiella pneumoniae* under *in vivo* conditions

SOCIAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH ORGANIZING

181 Chukreyev M.P., Kalinkin D.E.

Satisfaction with the quality of outpatient care of medical students as an element of the assessment of the current system of medical care

Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины

Основная цель журнала — информирование читательской аудитории о новейших достижениях и перспективах развития отечественной и зарубежной медицинской науки, формирование научного мировоззрения, передача научной эстафеты от авторитетных исследователей молодым ученым, активная пропаганда принципов научно обоснованной клинической практики. Приоритетно публикуются работы, посвященные проблемам фундаментальной и прикладной кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии, а также смежным научным дисциплинам. Наряду с обсуждением общемировых трендов большое внимание уделяется результатам исследования популяционных закономерностей, особенностям клинического течения и исходов, а также специфике оказания специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи при сердечно-сосудистых заболеваниях и коморбидной патологии в экстремальных условиях сибирских территорий.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Р.С. Карпов

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/284>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор

karпов@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0002-7011-4316>

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

С.В. Попов

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/352>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор

psv@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0002-9050-4493>

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

Ottavio R. Alfieri

<https://www.radcliffcardiology.com/authors/ottavio-alfieri>

M.D., Ph.D., Professor

alfieri.ottavio@hsr.it; ottavio.alfieri@hsr.it

San Raffaele Scientific Institute, University Hospital (Milan, Italy)

<https://orcid.org/0000-0003-1065-8052>

Н.Д. Анфиногенова

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/213>

д-р мед. наук

cardio.intl@gmail.com

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0003-1106-0730>

Г.В. Артамонова

<https://kemcardio.ru/o-kkcz/nii-kpssz/apparat-upravleniya/artamonova-galina-vladimirovna.html>

д-р мед. наук, профессор

artamonova@kemcardio.ru

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия)

<http://orcid.org/0000-0003-2279-3307>

Dmitriy N. Atochin

<http://cvrc.massgeneral.org/faculty/dmitriy-atochin-phd/>

M.D., Ph.D., Assoc. Professor

datochin@mgh.harvard.edu; Atochin@tpu.ru

Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School (Boston, USA)

<https://orcid.org/0000-0002-2405-2070>

И.А. Трубачева

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/397>

д-р мед. наук

tia@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0003-1063-7382>

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

С.Е. Пекарский

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/340>

д-р мед. наук

pekarSKI@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0002-4008-4021>

С.А. Афанасьев

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/216>

д-р мед. наук, профессор

tursky@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Л.И. Афтанас

<http://physiol.ru/structure/direktsiya/aftanas>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор

liaftanas@gmail.com

Сибирское отделение Российской академии наук; Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины (Новосибирск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0003-3605-5452>

Л.С. Барбараш

<https://kemcardio.ru/nauka/fond-molodyix-uchyonix/barbarash-leonid-semenovich.html>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия)

<http://orcid.org/0000-0001-6981-9661>

О.Л. Барбараш

<https://kemcardio.ru/o-kkcz/nii-kpssz/apparat-upravleniya/barbarash-olga-leonidovna.html>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор

liaftanas@gmail.com

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия)

<http://orcid.org/0000-0002-4642-3610>

А.А. Бощенко<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/227>

д-р мед. наук

bosh@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0001-6009-0253>**А.В. Врублевский**<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/241>

д-р мед. наук

avr@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0002-7981-8547>**А.А. Гарганеева**<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/244>

д-р мед. наук, профессор

aag@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0002-9488-6900>**В.В. Гафаров**<http://assa.bionet.nsc.ru/open/department/0d29208c-217b-11e2-ae25-0025226b781e/>

д-р мед. наук, профессор

gafarovvv@bionet.nsc.ru; gafarov@gmail.com

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0001-5701-7856>**Ю.И. Гринштейн**[https://krasgmu.ru/index.php?page\[common\]=user&id=1229](https://krasgmu.ru/index.php?page[common]=user&id=1229)

д-р мед. наук, профессор

grinstein.yi@mail.ru

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации (Красноярск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0002-4621-161>**Haim Danenberg**<http://www.hadassah-med.com/doctors/prof-danenberg-haim>

M.D., Ph.D., Professor

danen@hadassah.org.il; haimd@ekmd.huji.ac.il

Head of Interventional Cardiology Unit, Dept. of Cardiology, Heart Institute (Jerusalem, Israel)

<https://orcid.org/0000-0002-1349-9627>**А.П. Дергилев**<http://ngmu.ru/users/40578>

д-р мед. наук, профессор

danen@hadassah.org.il; haimd@ekmd.huji.ac.il

Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (Новосибирск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0002-8637-4083>**James M. Downey**<https://www.southalabama.edu/ishr/cvsimulation/JMDCVtable.htm>

Ph.D.

jdowney@southal.edu; Fred.downey@unthsc.edu

College of Medicine, University of South Alabama (Mobile, USA)

<https://orcid.org/0000-0002-3430-530X>**А.В. Евтушенко**http://wiki.ssmu.ru/index.php/Евтушенко_Алексей_Валерьевич

д-р мед. наук

ave@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия)

<http://orcid.org/0000-0001-8475-4667>**Yi Zhang**https://www.researchgate.net/profile/Yi_Zhang240

Ph.D., Professor

zhyhenryphy@163.com

Hebei Medical University (Hebei, China)

<https://orcid.org/0000-0003-0869-3940>**В.В. Калюжин**<http://www.ssmu.ru/ru/obrazovanie/departments/goster/kalyujin/>

д-р мед. наук, профессор

kalyuzhinvv@mail.ru

Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (Томск, Россия)

<http://orcid.org/0000-0001-9640-2028>**Jaroslaw D. Kasprzak**https://www.researchgate.net/profile/Jaroslaw_Kasprzak

M.D., Ph.D., Professor

kebtkebt@gmail.com

Medical University of Lodz, Bieganski Hospital (Lodz, Poland)

<https://orcid.org/0000-0002-5850-8187>**Julia Kzhyshkowska**<https://persona.tsu.ru/home/UserProfile/7837>

д-р биол. наук, профессор

julia.kzhyshkowska@googlemail.com

Гейдельбергский университет (Гейдельберг, Германия); Томский государственный университет (Томск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0003-0898-3075>**И.А. Ковалев**<http://pedklin.ru/staff/kovalyov-igor-aleksandrovich>

д-р мед. наук, профессор

kovalev@pedklin.ru; kovalev64@mail.ru

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

<http://orcid.org/0000-0002-9269-0170>**Frantisek Kolar**<http://www.heartacademy.org/phpwcm/index.php?09>

M.D., Ph.D., Professor

kolar@biomed.cas.cz

Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic)

<https://orcid.org/0000-0002-8723-1826>

С.М. Комиссарова

<https://belmedtourism.com/vrachi/kardiologiya/konsultant-kardiolog/komissarova-s-m/>

д-р мед. наук
korn_svet@mail.ru

Республиканский научно-практический центр «Кардиология» (Минск, Республика Беларусь)
<http://orcid.org/0000-0001-9917-5932>

Р.Д. Курбанов

д-р мед. наук, академик АН Узбекистана, профессор
ravshanbek.kurbanov@minzdrav.uz

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр кардиологии (Республика Узбекистан)
<https://orcid.org/0000-0001-7309-2071>

Н.П. Митьковская

<https://www.bsmu.by/page/11/350/>

д-р мед. наук, профессор
mitkovskaya1@mail.ru

Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Республика Беларусь)
<https://orcid.org/0000-0002-9088-721X>

Navin C. Nanda

https://www.researchgate.net/profile/Navin_Nanda

M.D., Ph.D., Professor
wchapman@uabmc.edu

Echocardiography Laboratories at the University of Alabama (Birmingham, USA)
<https://orcid.org/0000-0002-9657-5620>

С.А. Некрылов

<http://www.if.tsu.ru/chair2/nekrylov.htm>

д-р ист. наук, профессор
Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия)
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6504398728>

Eli Ovsyshcher

<https://www.semanticscholar.org/author/Eli-I-Ovsyshcher/14433397>

M.D., Ph.D., Professor
eliovsy@bgu.ac.il

Soroka University Medical Center for Cardiology (Beer-Sheva, Israel)
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6505953753>

И.В. Осипова

<http://www.agmu.ru/about/fakultet/lechebnyy-fakultet/kafedra-fakultetskoy-terapii/>

д-р мед. наук, профессор
i.v.osipova@gmail.com

Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (Барнаул, Россия)
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7005749604>

Natesa G. Pandian

https://www.researchgate.net/profile/Natesa_Pandian2

M.D., Professor
n.pandian@gmail.com

Heart & Vascular Institute, Hoag Hospital, Tufts University School of Medicine, Tufts Medical Center (Boston, USA)
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7102263209>

Fausto J. Pinto

<https://esc365.escardio.org/Person/345-prof-pinto-fausto-jose>

M.D., Ph.D., Professor
Academic Center of Medicine of Lisbon (Lisbon, Portugal)
<http://orcid.org/0000-0002-8034-4529>

В.П. Пузырев

<http://onco.tnimc.ru/kontakty/personalii/tnimc/puzыrev-valeriy-pavlovich/>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор
p.valery@medgenetics.ru

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)
<http://orcid.org/0000-0002-2113-4556>

А.Н. Репин

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/364>

д-р мед. наук, профессор
ran@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)
<http://orcid.org/0000-0001-7123-0645>

В.В. Рябов

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/369>

д-р мед. наук
rvvt@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия)
<http://orcid.org/0000-0002-4358-7329>

Igor Feoktistov

<https://medschool.vanderbilt.edu/pharmacology/person/igor-feoktistov-ph-d-c-sc/>

M.D, Ph.D., Professor
rvvt@cardio-tomsk.ru

Vanderbilt University (Nashville, USA)
<https://orcid.org/0000-0001-5611-7732>

Leon J. Frazin

https://www.vitals.com/doctors/Dr_Leon_Frazin.html

M.D., Ph.D.
lfrazin@aol.com

UIC College of Medicine (Chicago, USA)
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6701727743>

Michal Chudzik

<https://www.pubfacts.com/author/Michal+Chudzik>

M.D., Professor
luk.szyda@gmail.com

Medical University of Lodz (Lodz, Poland)
<https://orcid.org/0000-0001-8805-9688>

Е.Л. Чойнзонов

<http://onco.tnimc.ru/kontakty/personalii/tnimc/choynzonov-evgeniy-lkhamatsyrenovich/>

д-р мед. наук, академик РАН, профессор
choynzonov@tnimc.ru

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (Томск, Россия)
<http://orcid.org/0000-0002-3651-0665>

Е.В. Шляхтоhttp://www.almazovcentre.ru/?page_id=125

д-р мед. наук, академик РАН, профессор

e.shlyakhto@almazovcentre.ru

Национальный медицинский исследовательский центр

им. В.А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия)

<http://orcid.org/0000-0003-2929-0980>**Jan Janousek**<http://www.fnmotol.cz/detske-kardiocentrum/vedeni-a-personal/>

M.D., Ph.D., Professor

jan.janousek@fnmotol.cz

Head of Children's Heart Centre, University Hospital Motol

(Prague, Czech Republic)

<http://orcid.org/0000-0002-4932-1150>**ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ****С.И. Карась**<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/283>

д-р мед. наук

ksi@cardio-tomsk.ru

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский

национальный исследовательский медицинский центр Рос-

сийской академии наук (Томск, Россия)

<https://orcid.org/0000-0001-6716-856X>**РЕДАКЦИОННЫЕ КОНТАКТЫ:**smj@cardio-tomsk.ru; +7 (3822) 558 263

С правилами по оформлению статей можно ознакомиться на сайте журнала по адресу:
<https://cardiotomsk.elpub.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>

История издания журнала	Регулярная публикация выпусков журнала началась в 1996 году после 65-летнего перерыва. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук.
Периодичность	Ежеквартально
Префикс DOI	10.29001
ISSN print	2713-2927
ISSN online	2713-265X
Свидетельство о регистрации средства массовой информации	Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор). Рег. номер: ПИ № ФС 77-78659 от 30.07.2020
Стоимость одного выпуска	Свободная цена
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель Издатель	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ), 634050, Российская Федерация, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Редакция	Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а. Тел./факс: (3822) 55-84-10, e-mail: smj@cardio-tomsk.ru, http://www.cardio-tomsk.ru
Редакторы	О.М. Рудникович, Т.Н. Вазим, Н.Д. Анфиногорова
Переводчик	А.П. Игнашина
Логистик	Д.А. Дедков
Менеджер	Т.В. Тихонова
Оригинал-макет	ООО «Литбюро» 634055, Российская Федерация, Томск, ул. Королева, 4
Тираж	500 экз.
Типография	Журнал отпечатан на полиграфическом оборудовании Издательского дома Томского государственного университета 634050, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 36
Выход в свет	29.03.2023

The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine

The journal allows readers to get acquainted with the latest developments in medical science and practice. It promotes ideals and integrity that the leaders of Siberian medicine have been committed to. Primary remit of the journal focuses on the key questions of cardiology, cardiac surgery, and related scientific disciplines. We encourage publication of papers addressing the etiology, pathogenesis, epidemiology, clinical presentation, state-of-the-art diagnostics, prevention, treatment, cardiovascular comorbidities, rehabilitation, and improvement of medical care for cardiovascular patients.

EDITOR-IN-CHIEF

Rostislav S. Karpov

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/284>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

karpov@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-7011-4316>

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Sergey V. Popov

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/352>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

psv@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0002-9050-4493>

EDITORIAL BOARD

Ottavio R. Alfieri

<https://www.radcliffecardiology.com/authors/ottavio-alfieri>

M.D., Ph.D., Professor

alfieri.ottavio@hsr.it; ottavio.alfieri@hsr.it

San Raffaele Scientific Institute, University Hospital (Milan, Italy)

<https://orcid.org/0000-0003-1065-8052>

Nina D. Anfinogenova

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/213>

Dr. Sci. (Med.)

cardio.intl@gmail.com

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0003-1106-0730>

Galina V. Artamonova

<https://kemcardio.ru/o-kkcz/nii-kpssz/apparat-upravleniya/artamonova-galina-vladimirovna.html>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

artamonova@kemcardio.ru

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Kemerovo, Russia)

<http://orcid.org/0000-0003-2279-3307>

Dmitriy N. Atochin

<http://cvrc.massgeneral.org/faculty/dmitriy-atochin-phd/>

M.D., Ph.D., Assoc. Professor

datochin@mgh.harvard.edu; Atochin@tpu.ru

Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School (Boston, USA)

<https://orcid.org/0000-0002-2405-2070>

Irina A. Trubacheva

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/397>

M.D., Dr. Sci. (Med.)

tia@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0003-1063-7382>

SCIENTIFIC EDITOR

Stanislav E. Pekarsky

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/340>

M.D., Dr. Sci. (Med.)

pekarski@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0002-4008-4021>

Sergey A. Afanasiev

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/216>

Dr. Sci. (Med.), Professor

tursky@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Lubomir I. Aftanas

<http://physiol.ru/structure/direktsiya/aftanas>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

liaftanas@gmail.com

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Research Institute of Physiology and Basic Medicine (Novosibirsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0003-3605-5452>

Leonid S. Barbarash

<https://kemcardio.ru/nauka/fond-molodyix-uchyonyix/barbarash-leonid-semenovich.html>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Kemerovo, Russia)

<http://orcid.org/0000-0001-6981-9661>

Olga L. Barbarash

<https://kemcardio.ru/o-kkcz/nii-kpssz/apparat-upravleniya/barbarash-olga-leonidovna.html>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

liaftanas@gmail.com

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Kemerovo, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-4642-3610>

Alla A. Boshchenko<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/227>

M.D., Dr. Sci. (Med.)

bosh@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0001-6009-0253>**Alexander V. Vrublevskiy**<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/241>

M.D., Dr. Sci. (Med.)

avr@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-7981-8547>**Alla A. Garganeeva**<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/244>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

aag@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-9488-6900>**Valeriy V. Gafarov**<http://assa.bionet.nsc.ru/open/department/0d29208c-217b-11e2-ae25-0025226b781e/>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

gafarovvv@bionet.nsc.ru; gafarov@gmail.com

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0001-5701-7856>**Yury I. Greenstein**[https://krasgmu.ru/index.php?page\[common\]=user&id=1229](https://krasgmu.ru/index.php?page[common]=user&id=1229)

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

grinstein.yi@mail.ru

Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0002-4621-161>**Haim Danenberg**<http://www.hadassah-med.com/doctors/prof-danenberg-haim>

M.D., Ph.D., Professor

danen@hadassah.org.il; haimd@ekmd.huji.ac.il

Head of Interventional Cardiology Unit, Dept. of Cardiology, Heart Institute (Jerusalem, Israel)

<https://orcid.org/0000-0002-1349-9627>**Alexander P. Dergilev**<http://ngmu.ru/users/40578>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

danen@hadassah.org.il; haimd@ekmd.huji.ac.il

Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0002-8637-4083>**James M. Downey**<https://www.southalabama.edu/ishr/cvsimulation/JMDCVtable.htm>

Ph.D.

jdowney@usouthal.edu; Fred.downey@unthsc.edu

College of Medicine, University of South Alabama (Mobile, USA)

<https://orcid.org/0000-0002-3430-530X>**Alexey V. Evtushenko**http://wiki.ssmu.ru/index.php/Евтушенко_Алексей_Валерьевич

M.D., Dr. Sci. (Med.)

ave@cardio-tomsk.ru

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Kemerovo, Russia)

<http://orcid.org/0000-0001-8475-4667>**Yi Zhang**https://www.researchgate.net/profile/Yi_Zhang240

Ph.D., Professor

zhyhenryphy@163.com

Hebei Medical University (Hebei, China)

<https://orcid.org/0000-0003-0869-3940>**Vadim V. Kalyuzhin**<http://www.ssmu.ru/ru/obrazovanie/departments/goster/kalyujin/>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

kalyuzhinvv@mail.ru

Siberian State Medical University (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0001-9640-2028>**Jaroslaw D. Kasprzak**https://www.researchgate.net/profile/Jaroslaw_Kasprzak

M.D., Ph.D., Professor

kebtkebt@gmail.com

Medical University of Lodz, Bieganski Hospital (Lodz, Poland)

<https://orcid.org/0000-0002-5850-8187>**Julia Kzhyshkowska**<https://persona.tsu.ru/home/UserProfile/7837>

Ph.D., Dr. Sci. (Biol.), Professor

julia.kzhyshkowska@googlemail.com

University of Heidelberg (Heidelberg, Germany); Tomsk State University (Tomsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0003-0898-3075>**Igor A. Kovalev**<http://pedklin.ru/staff/kovalyov-igor-aleksandrovich>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

д-р мед. наук, профессор

kovalev@pedklin.ru; kovalev64@mail.ru

Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-9269-0170>**Frantisek Kolar**<http://www.heartacademy.org/phpwpcms/index.php?09>

M.D., Ph.D., Professor

kolar@biomed.cas.cz

Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic)

<https://orcid.org/0000-0002-8723-1826>**Svetlana M. Komissarova**<https://belmedtourism.com/vrachi/kardiologiya/konsultant-kardiolog/komissarova-s-m/>

M.D., Dr. Sci. (Med.)

kom_svet@mail.ru

Republican Scientific and Practical Centre "Cardiology" (Minsk, Belarus Republic)

<http://orcid.org/0000-0001-9917-5932>

Ravshanbek D. Kurbanov

M.D., Dr. Sci. (Med.)

ravshanbek.kurbanov@minzdrav.uz

Full Member of the Uzbekistan Academy of Sciences, Professor at the Republican Specialized Cardiology Center (Tashkent, Uzbekistan)

<https://orcid.org/0000-0001-7309-2071>

Natalya P. Mitkovskaya

<https://www.bsmu.by/page/11/350/>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

mitkovskaya1@mail.ru

Scientific and Practice Center "Cardiology", Belarus State Medical University (Minsk, Belarus Republic)

<https://orcid.org/0000-0002-9088-721X>

Navin C. Nanda

https://www.researchgate.net/profile/Navin_Nanda

M.D., Ph.D., Professor

wchapman@uabmc.edu

Echocardiography Laboratories at the University of Alabama (Birmingham, USA)

<https://orcid.org/0000-0002-9657-5620>

Sergey A. Nekrylov

<http://www.if.tsu.ru/chair2/nekrylov.htm>

Dr. Sci. (History), Professor

Tomsk State University (Tomsk, Russia)

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6504398728>

Eli Ovsyshcher

<https://www.semanticscholar.org/author/Eli-I-Ovsyshcher/14433397>

M.D., Ph.D., Professor

eliovsy@bgu.ac.il

Soroka University Medical Center for Cardiology (Beer-Sheva, Israel)

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6505953753>

Irina V. Osipova

<http://www.agmu.ru/about/fakultet/lechebnyy-fakultet/kafedra-fakultetskoy-terapii/>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

i.v.osipova@gmail.com

Altay State Medical University (Barnaul, Russia)

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7005749604>

Natesa G. Pandian

https://www.researchgate.net/profile/Natesa_Pandian2

M.D., Professor

n.pandian@gmail.com

Heart & Vascular Institute, Hoag Hospital, Tufts University School of Medicine, Tufts Medical Center (Boston, USA)

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7102263209>

Fausto J. Pinto

<https://esc365.escardio.org/Person/345-prof-pinto-fausto-jose>

M.D., Ph.D., Professor

Academic Center of Medicine of Lisbon (Lisbon, Portugal)

<http://orcid.org/0000-0002-8034-4529>

Valeriy P. Puzyrev

<http://onco.tnmc.ru/kontakty/personalii/tnimc/puzyrev-valeriy-pavlovich/>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

p.valery@medgenetics.ru

Research Institute for Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-2113-4556>

Alexey N. Repin

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/364>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Professor

ran@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0001-7123-0645>

Vyacheslav V. Ryabov

<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/369>

M.D., Dr. Sci. (Med.)

rvvt@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-4358-7329>

Igor Feoktistov

<https://medschool.vanderbilt.edu/pharmacology/person/igor-feoktistov-ph-d-c-sc/>

M.D, Ph.D., Professor

rvvt@cardio-tomsk.ru

Vanderbilt University (Nashville, USA)

<https://orcid.org/0000-0001-5611-7732>

Leon J. Frazin

https://www.vitals.com/doctors/Dr_Leon_Frazin.html

M.D., Ph.D.

lfrazin@aol.com

UIC College of Medicine (Chicago, USA)

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6701727743>

Michal Chudzik

<https://www.pubfacts.com/author/Michal+Chudzik>

M.D., Professor

luk.szyda@gmail.com

Medical University of Lodz (Lodz, Poland)

<https://orcid.org/0000-0001-8805-9688>

Evgeny L. Choyzonov

<http://onco.tnmc.ru/kontakty/personalii/tnimc/choyzonov-evgeniy-lkhamatsyrenovich/>

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

choyzonov@tnimc.ru

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<http://orcid.org/0000-0002-3651-0665>

Evgeny V. Shlyakhtohttp://www.almazovcentre.ru/?page_id=125

M.D., Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor

e.shlyakhto@almazovcentre.ru

Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia)

<http://orcid.org/0000-0003-2929-0980>**Jan Janousek**<http://www.fnmotol.cz/detske-kardiocentrum/vedeni-a-personal/>

M.D., Ph.D., Professor

jan.janousek@fnmotol.cz

Head of Children's Heart Centre, University Hospital Motol (Prague, Czech Republic)

<http://orcid.org/0000-0002-4932-1150>**EXECUTIVE SECRETARY****Sergey I. Karas**<https://www.cardio-tomsk.ru/employees/283>

Dr. Sci. (Med.)

ksi@cardio-tomsk.ru

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

<https://orcid.org/0000-0001-6716-856X>

History of publication of the journal	Regular publication of the Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine has been restarted in 1996 after 65-year gap. The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine is included in the list of peer-reviewed journals recommended for publication of the results of doctoral theses for academic degrees of Candidate and Doctor of Medical Sciences
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.29001
ISSN print	2713-2927
ISSN online	2713-265X
Mass media registration certificate	The Journal is registered in the Federal Service for Supervision of IT and Communications No. FS 77-78659, 30.07.2020
The cost of one issue	Free price
Content distribution terms	This content is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License
Founder Publisher	Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk NRMC), 634050, 10, Naberezhnaya Reki Ushaiki, Tomsk, 634012, Russian Federation
Editorial office	Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation Tel./fax 7 (8-3822) 55-84-10, e-mail: smj@cardio-tomsk.ru , http://www.cardio-tomsk.ru
Editors:	O.M. Rudnikovich, T.N. Vazim, N.D. Anfinogenov
Translator:	A.P. Ignashina
Logistician:	D.A. Dedkov
Manager:	T.V. Tikhonova
Original layout:	OOO "Litburo" 4, Koroleva str., Tomsk, 634055, Russian Federation
Circulation	500 copies
Printing house	Tomsk State University Publishing House 36, Lenina str., Tomsk, 634050, Russian Federation
Date of issue	March 29, 2023

От редакторов выпуска

Глубокоуважаемые читатели!

Сегодня мы представляем вашему вниманию специальный выпуск «Сибирского журнала клинической и экспериментальной медицины», посвященный проблемам фундаментальной медицины. Выпуск был задуман как обзор современных исследований от патологической физиологии через аппликацию в клинические фундаментальные работы к проблемам биоинженерии и фармакологии.

Расширение представлений о патогенезе заболеваний всегда являлось и является основой медицинской науки. В представленном выпуске вопросам патогенеза ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, постинфарктного кардиосклероза, метаболического синдрома посвящен ряд клинических и экспериментальных работ.

Обзоры, вошедшие в состав выпуска, рассматривают вопросы патогенеза воспаления, артериальной гипертензии; перспективы применения новых маркеров и методов для стратификации сердечно-сосудистого риска; значимость морфофункциональных характеристик тесно связанной с патологией миокарда эпикардиальной жировой ткани.

Интересно отметить, что воздействие на некоторые молекулярные мишени, показавшее свою эффективность в экспериментальных работах, не приводит к желаемым эффектам при клинических исследованиях. Размышляя о причинах этого несоответствия, можно предположить, что реализации физиологических или фармакологических протекторных воздействий могут препятствовать возраст пациента и метаболические нарушения. Ряд статей нашего выпуска посвящен рассмотрению вопросов влияния возраста, диабета, ожирения, в том числе экспансии эпикардиальной жировой ткани, на реализацию физиологических и патологических процессов организма и эффективность протекторных воздействий.

Среди статей наблюдательного и экспериментального характера выделяется блок работ по тканевой инженерии. Исследователи представили результаты своих работ по созданию и модифицированию биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра проангиогенными факторами с дополнительной модификацией их поверхности лекарственными веществами белковой природы, препаратами с антиагрегантной и антикоагулянтной активностью, что позволяет повысить долгосрочную проходимость и качество ремоделирования сосуда. Тематику выпуска логично завершили статьи, посвященные разработке новых фармакологических субстанций. В выпуске представлены работы авторов из 11 научных учреждений 8 городов Российской Федерации.

Сердечно благодарим авторов за интересные и содержательные статьи, желаем им успехов в творческой деятельности!



Ткачук Всеволод Арсеньевич, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова



Нарыжная Наталья Владимировна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии Томского НИМЦ

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-13-20>
УДК 616-002-085.276:577.152.6

Индукцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна?

М.М. Галагудза¹, Ю.П. Бельский¹, Н.В. Бельская²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197341, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

² Акционерное общество «Генериум», Испытательный центр «Центр доклинических исследований», 601125, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14

Аннотация

Обзор посвящен текущему пониманию роли оксида азота (NO) и индуцибельной NO-синтазы в физиологических условиях и при некоторых патологических состояниях. Рассмотрены механизмы индукции экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы и посттранскрипционной регуляции активности индуцибельной NO-синтазы, приведены сведения об эндогенных ингибиторах индуцибельной NO-синтазы. Проведен анализ статуса клинических исследований, направленных на изучение клинической эффективности ингибиторов NO-синтаз.

Ключевые слова:	оксид азота, ингибитор индуцибельной синтазы оксида азота, доклинические исследования, клинические испытания.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Для цитирования:	Галагудза М.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):13–20. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-13-20 .

Inducible NO synthase as a pharmacological target of anti-inflammatory therapy: hope is not lost?

Michael M. Galagudza,¹ Yury P. Belsky,¹ Natalia V. Belsky²

¹ Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of Russian Federation, 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russian Federation

² Joint Stock Company “Generium”, Test Center “Center for Preclinical Research”, 14, Vladimirskaya str., Volginskii vill., Petushinskii dist., Vladimirskaya region, 601125, Russian Federation

Abstract

The review is devoted to the current assesment of the role of nitric oxide and inducible NO-synthase in physiological and pathological conditions. The inducible NO-synthase gene expression induction and post-transcriptional regulation of its activity are considered. Data on endogenous inducible NO-synthase inhibitors of are given. An analysis of the clinical trials aimed at studying the clinical efficacy of NO synthase inhibitors was carried out.

Keywords:	nitric oxide, inhibitor of inducible nitric oxide synthase, preclinical trials, clinical trials.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	none of the authors has a financial interest in the presented materials or methods.
For citation:	Galagudza M.M., Belsky Y.P., Belsky N.V. Inducible NO synthase as a pharmacological target of anti-inflammatory therapy: hope is not lost? <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):13–20. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-13-20 .

Бельский Юрий Павлович, e-mail: belsky59@mail.ru

Введение

Оксид азота (NO) образуется из аминокислоты L-аргинина ферментами NO-синтазами. Время полураспада NO составляет всего около 5 с, что ограничивает роль данного соединения локальной регуляцией кровотока и других функций. NO-синтазы распределены в разных соотношениях в различных органах. Так, имеются три изоформы NO-синтазы, участвующие в синтезе NO: две конститутивные NO-синтазы, всегда присутствующие в клетках (нейрональная и эндотелиальная), и индуцибельная NO-синтаза (iNOS или NOS2), активность которой определяется действием на клетку стимулирующих факторов.

В настоящем обзоре рассматривается функциональное значение iNOS, принципы регуляции экспрессии и активности данного фермента, а также роль образующегося в результате активации iNOS оксида азота в патологических процессах.

Индукция экспрессии гена iNOS

iNOS представляет собой небольшой белок с молекулярной массой 131 кДа, состоящий из 1153 аминокислот, которые собраны в два основных домена: С-концевую редуктазу, содержащую субдомен, связывающий флавиномононуклеотид (FMN), и N-концевую оксигеназу. Белок iNOS имеет гомодимерную четвертичную структуру с цинковыми мостиками [1]. Две другие изоформы – нейрональная (nNOS или NOS1) и эндотелиальная (eNOS или NOS3) – регулируются связыванием кальция и кальмодулина, тогда как iNOS регулируется транскрипционно и не зависит от кальция и кальмодулина.

iNOS экспрессируется только в активированных клетках и индуцируется микробными продуктами (липолисахаридом) и воспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-1 β (IL-1 β), фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерферон (IFN- γ) [2]. Кроме того, гипоксия также может стимулировать экспрессию гена iNOS [3]. Выработка NO индуцибельной NO-синтазой начинается через несколько часов после индукции и может продолжаться до 5 дней [2]. Количество вырабатываемого NO конститутивными NOS невелико – от пико- до наномоль, в то время как iNOS способна вырабатывать на несколько порядков больше – более микромоль [2].

Способностью экспрессировать iNOS и производить NO обладают не только клетки врожденного и адаптивного иммунитета (моноциты, нейтрофилы, тучные клетки, макрофаги, Т-лимфоциты), но и эндотелиальные и гладкомышечные клетки [4], гепатоциты, хондроциты, глиальные клетки, астроциты, нейроны, кардиомиоциты [1]. Показано, что такой способностью могут обладать и опухолевые клетки, используя NO как защиту от противоопухолевых механизмов [4, 5].

Основным внутриклеточным путем передачи сигналов вышеуказанных стимуляторов экспрессии гена iNOS является активация транскрипционного фактора NF- κ B; активный фактор перемещается в ядро клетки, связывается с промоторным регионом гена iNOS и индуцирует экспрессию гена iNOS [6]. IFN- γ активирует путь JAK / STAT-1 α : IFN- γ вызывает димеризацию рецептора IFN- γ и активацию Янус киназ (JAK, в частности JAK2), которые затем фосфорилируют STAT-1 α , который затем димеризуется и транслоцируется к ядру, где способствует синтезу регуляторного фактора интерферона 1 (IRF-1). Затем IRF-1 связывается с промотором гена iNOS и индуцирует экспрессию iNOS [1, 7].

Посттранскрипционная регуляция активности iNOS

Посттранскрипционная регуляция экспрессии гена iNOS преимущественно происходит с помощью механизмов, которые влияют на стабильность мРНК iNOS и регуляцию каталитической активности [8].

Ферментом, конкурирующим с iNOS за субстрат (L-аргинин), является аргиназа, которая в цикле мочевины превращает аргинин в орнитин и мочевину. Исследования показали, что ингибирование аргиназы приводит к увеличению синтеза NO в макрофагах кролика и крысы, в воспаленных легких мыши [1], а избыточная экспрессия аргиназы, например, в кератиноцитах человека, вовлечена в механизм заболевания псориазом, воспалительным заболеванием кожи [1]. В условиях развития Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа у мышей при повышении экспрессии iNOS и продукции NO наблюдалось снижение экспрессии аргиназы и продукции мочевины [9].

Стимулы, приводящие к повышению экспрессии iNOS, также вызывают увеличение экспрессии транспортеров катионных аминокислот CAT 1, CAT2 и CAT3, которые транспортируют аргинин через клеточную мембрану [1]. Дефицит этих транспортеров, напротив, снижает активность iNOS, что показано при делеции гена CAT2 в астроцитах [1]. Кроме того, при индукции iNOS в макрофагах, гладкомышечных клетках сосудов, микроглии и нейронах наблюдается и повышение экспрессии аргининосукцинатсинтетазы, которая преобразует L-цитруллин (побочный продукт при синтезе NO) обратно в L-аргинин [1].

Активность iNOS в значительной степени зависит от кофактора тетрагидробиоптерина (H4B), обеспечивающего димеризацию iNOS, без чего фермент не активен. Это показали исследования на клеточных линиях: чем больше клетки продуцировали H4B, тем выше была активность iNOS, а добавление в культуру клеток с низким уровнем H4B предшественника H4B (сепиаптерин) значительно увеличивало и активность iNOS [1].

Негативным регулятором iNOS является ее продукт – NO. На макрофагах мыши показано, что внесение в культуру скавенджера NO (гемоглобин) влечет за собой увеличение активности iNOS, а добавление доноров NO приводит к значительному снижению активности iNOS, которая не восстанавливается при удалении доноров NO, что указывает на необратимость действия [1]. Наиболее вероятным механизмом такой деактивации может быть S-нитрозирование кластера тетраиолатата цинка, ведущее к необратимой диссоциации димера молекулы iNOS с последующей утратой активности [1].

Функции NO/iNOS

Существует 2 пути реализации физиологической функции NO: зависимый и не зависимый от циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) [4]. NO взаимодействует с активным центром растворимой гуанилатциклазы (sGC) с образованием цГМФ, который затем активирует протеинкиназу G (PKG) с последующим фосфорилированием субстратов [4]. Этот механизм является основным для конститутивных форм NOS, в то время как для iNOS основным механизмом реализации функции служит цГМФ-независимый, для которого характерно образование ряда радикалов и продуктов их взаимодействия с эндогенными белками. При взаимодействии NO с молекулой кислорода (в аэробных условиях) образуется реакционноспособный промежуточный продукт (RNOS), а при его взаимодействии с супероксидным радикалом O₂

промежуточный продукт преобразуется в пероксинитрит (ONOO⁻), который является мощным окислительным и нитрозирующим агентом. В биологических жидкостях основным продуктом окисления является азотистый ангидрид (N₂O₃), который нестабилен и быстро распадается до тиолов или аминов. Все эти продукты способны модифицировать азотистые основания в ДНК и индуцировать одноцепочечные разрывы в ДНК [2]. Основная функция появившихся продуктов – уничтожение патогенных микроорганизмов.

Итог действия продуктов радикального механизма на клетки зависит от концентрации: при более низкой концентрации NO его действие оказывается, как правило, антиапоптотическим, но при более высокой концентрации он действует как проапоптотическая молекула [2].

Роль NO/iNOS в патологических состояниях

Избыточная и неоправданно долгая выработка повышенного количества NO является ключевым механизмом воспаления, что хорошо показано в научной литературе, например, при воспалительных заболеваниях суставов и дегенеративных заболеваниях опорно-двигательного аппарата [10]; инфекционно-воспалительных заболеваниях, в том числе вызванных вирусами [11] или паразитами – лейшманиозе [12]; при сахарном диабете [7], нейродегенеративных заболеваниях [1], сепсисе, кардиальной дисфункции [13], нарушениях метаболизма глюкозы и липидов при метаболическом синдроме [7]. Мы остановимся кратко на онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях.

Опухолевый рост. Роль NO при опухолевом росте достаточно хорошо изучена. В низких концентрациях NO может способствовать пролиферации опухолевых клеток и оказывать антиапоптотическое действие, в то время как высокие концентрации, напротив, могут вызывать остановку клеточного цикла и апоптоз [14, 15], поскольку он вызывает повреждение ДНК и препятствует ее репарации. В других исследованиях показано, что NO может вызывать активацию онкогенов, посттрансляционную модификацию белков, индукцию мутации генов с накоплением мутантного p53, а также способствует ангиогенезу, эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) и метастазированию [2, 14]. Исследования показали, что низкие концентрации NO активируют сигнальный путь цГМФ, который опосредует как краткосрочное действие NO (от 5 мин. до 1 ч), так и длительное действие [14]. По мере увеличения концентрации NO может активироваться сигнальный путь PI3-киназы-Akt, который способствует миграции эндотелиальных клеток и ангиогенезу [16]. При повышении концентрации NO (> 1 мкМ) происходит стабилизация фактора, связанного с гипоксией (HIF-1α), который способствует подавлению пролиферации и замедлению заживления ран [17]. Показано, что в клетках рака молочной железы (клетках MCF7) сигнальные белки реагируют на различные количества NO: внеклеточно-сигнальная киназа (ERK) фосфорилируется на уровне 10–30 нМ, а Akt – при 30–60 нМ; если концентрация NO достигает 100 нМ, стабилизируется HIF-1; при повышении концентрации до 400 нМ происходит фосфорилирование p53 [14].

Экспрессия iNOS меняется по мере развития онкологической патологии: она снижается по мере увеличения стадии и становится низкой или не детектабельной в метастазах в легких и печени [18].

Источником NO могут быть сами опухолевые клетки. Так, например, в нормальных тканях кишечника экспрессия iNOS крайне низкая или отсутствует, в то время как почти 60% клеток аденомы толстой кишки человека экспрессируют ее в больших количествах [18]. При этом опухолевые клетки могут вырабатывать NO и стимулировать его продукцию, хотя сами обладают резистентностью к цитотоксическому действию NO [5].

Сложная ситуация с NO складывается в опухолевом окружении, насыщенном противоопухолевыми цитотоксическими Т-лимфоцитами, макрофагами и миелоидными супрессорными клетками. Первые два типа клеток, казалось бы, экспрессируя высокий уровень iNOS, должны уничтожать опухолевые клетки, однако этого часто не происходит по ряду причин. Одна из причин может заключаться в способности NO индуцировать появление популяции регуляторных клеток CD4+CD25+Foxp3⁻ (Tregs), которые подавляют функции эффекторных CD24+CD25⁻ Т-клеток [19], что подтверждается наблюдениями о наличии корреляции между частотой встречаемости в опухолевом микроокружении Treg и иммуносупрессией противоопухолевого ответа [20]. Некоторые авторы считают, что длительная антигенная стимуляция Т-клеток при опухолевом росте приводит к снижению интенсивности дифференцировки специфических к антигенам опухоли Т-лимфоцитов и истощению их пула [21], к повышенной экспрессии рецепторов, ингибирующих иммунные функции, например, PD-1, и снижению продукции цитокинов, способствующих противоопухолевому ответу, таких как IL-2, TNF-α и IFN [22]. Следует также обратить внимание на миелоидные супрессорные клетки, которые экспрессируют L-аргиназу 1, и таким образом в опухолевой ткани происходит истощение субстрата (аргинина), снижение экспрессии TCR и нарушение пролиферации Т-клеток [23]. Другими авторами отмечается, что механизм подавления противоопухолевых CD8 Т-клеток миелоидными супрессорными клетками может происходить через выработку ими NO, который подавляет пролиферацию Т-клеток и вызывает их апоптоз [24]. Не исключено, что вырабатываемый миелоидными супрессорами NO реагирует с кислородом и превращается в пероксинитрит, который нитрозилирует TCR и MHC. В свою очередь нарушается связывание TCR-MHC /антиген, что приводит к развитию у опухолевых клеток резистентности к апоптозу, опосредованному цитотоксическими Т-клетками [24].

В последние годы к вопросу о регуляции NO/iNOS стали обращаться в контексте способности NO вызывать или усиливать резистентность к лечению онкологических заболеваний химиопрепаратами на основе платины, ионизирующей лучевой и неионизирующей фотодинамической терапией. Клетки опухоли, выжившие после указанной терапии, часто приобретают более агрессивный фенотип, ускоряется и усиливается их пролиферация и миграция. Имеются экспериментальные данные, показывающие, что введение в комплекс лечения ингибиторов NO/iNOS может приводить к более успешному результату [25].

По мнению ряда исследователей, уровень экспрессии iNOS и циклооксигеназы 2 (COX-2) или только определение iNOS (с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или иммуноблот-анализа) являются надежным показателем выживаемости при раке, причем пациенты с самыми высокими уровнями имеют наименьшие шансы [26, 27]. Важное значение iNOS и COX-2 в развитии опухолей показывают и эксперимен-

тальные данные: при перевивном опухолевом росте молочной железы на iNOS-негативных мышах введение ингибитора COX-2 приводило не только к регрессии у 20–25% мышей, но и делало их резистентными к повторной перевивке опухолевых клеток, что показывает развитие полноценного противоопухолевого ответа при снятии функций iNOS и COX-2 [28].

Сердечно-сосудистые заболевания. Наибольшее очевидно роль NO/iNOS в той стадии патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, которая связана с воспалением. На мышинной модели, связанной с дефицитом аполипротеина E, показано, что снижение образования атеросклеротических поражений, вызванных диетой, связано с низким уровнем экспрессии iNOS [29]. В остром периоде инфаркта миокарда ингибирование iNOS и восстановление активности eNOS небивололом уменьшали размер инфаркта миокарда за счет предотвращения нитрозативного повреждения [30]. На модели атеросклероза, вызванного у кроликов холестериневой диетой с развитием гиперхолестеринемии, введение ингибитора iNOS (агматин) приводило к уменьшению выраженности атеросклеротических изменений [31]. У мышей с нокаутом iNOS введение бактериального липополисахарида вызывало эндотелиальную

дисфункцию (при оценке аорты и брыжеечных артерий), которая зависела от индукции iNOS [32]. Использование доноров NO при ишемическом прекодиционировании на мышинной модели оказывало на кардиопротекторное действие [33]. Сверхэкспрессия iNOS в кардиомиоцитах мыши вызывала брадиаритмию, кардиомиопатию и внезапную сердечную смерть [34]. Следует отметить, что единого мнения о роли NO/iNOS в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, исключая этап с преобладанием воспаления, пока не сложилось [35].

Имеются экспериментальные данные о влиянии ингибиторов iNOS на различные модели артериальной гипертензии у животных, которые показывают, что ингибирование iNOS оказывает антигипертензивное действие, уменьшает окислительный и нитрозативный стресс и улучшает функцию сосудов [36].

Ингибиторы iNOS

Нами был проведен поиск публикаций в базе PubMed по ключевым словам «Nitric oxide synthase inhibitor» и «Nitric oxide synthase inhibitors» с и без дополнительного фильтра «Clinical Trial», графическое отражение результатов поиска представлено на рисунке 1.

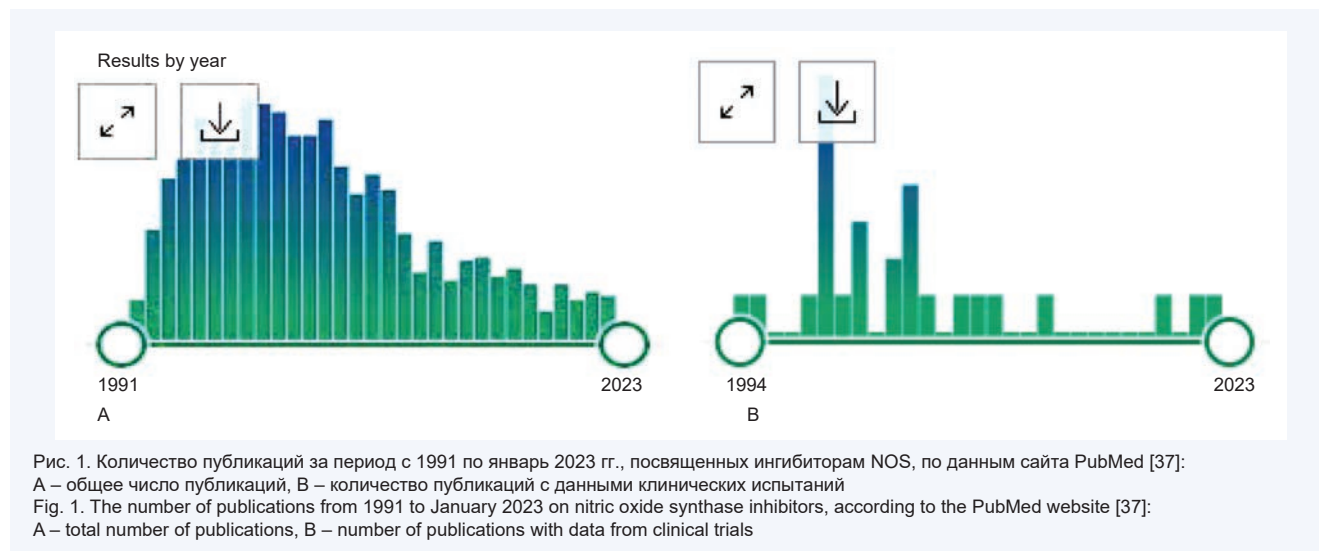


Рис. 1. Количество публикаций за период с 1991 по январь 2023 гг., посвященных ингибиторам NOS, по данным сайта PubMed [37]: A – общее число публикаций, B – количество публикаций с данными клинических испытаний
Fig. 1. The number of publications from 1991 to January 2023 on nitric oxide synthase inhibitors, according to the PubMed website [37]: A – total number of publications, B – number of publications with data from clinical trials

Отражением большого интереса к ингибиторам NOS как перспективным кандидатам в лекарственное средство является и число патентуемых соединений. Так, за 3 года (с 2011 по 2014 гг.) фармацевтическими компаниями и исследовательскими центрами было запатентовано более 100 новых малых молекул – ингибиторов NOS [38]. Среди фармацевтических компаний, ведущих разработки ингибиторов NO-синтазы: Altana Pharma (два класса препаратов – на основе oxazolo[4,5-B]pyridines и имидазола); Aventis Pharmaceuticals (производные кумарина); Nycomed (производные имидазопиридина); Schering (N-гетероциклические производные); Berlex; Pharmacia; Pfizer (S-[2[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine maleate hydrochloride); AstraZeneca (производные 3-arylthio-3-thiazolyl- и phenylarylamine).

Среди научных центров можно выделить: Северо-Западный университет (Эванстон, США) с разработкой хиральных соединений на основе пирролидина. Национальный университет Сеула, Корея (Seoul National University

Industry Foundation), в котором разрабатываются производные Theopederin. Обнадеживающие результаты на биологических моделях сепсиса, воспаления легких, артритов и аутоиммунного диабета получены при изучении таких соединений, как 1400W, GW274150 и GW273629, AR-C102222, ONO1714, ряда производных L-аргинина, L-NIL и SC-51 и ингибитора димеризации BBS-1.

Большое количество публикаций посвящено описанию ингибиторных свойств растительных компонентов в отношении iNOS [39]. Фарнезилфенолы (грифолины A и B, грифолин и неогрифолин), извлеченные из несъедобного гриба *Albatrellus caeruleoporus*, производные лигнана (эудесмин, манголин, янгабин, эпиманголин B) из *Magnolia fargesii*, фенантреноиды (юнкутол, юнкузол, дегидроюнкузол), выделенные из корневищ *Juncus acutus* L., 5-O-метилгирсутанонол, выделенный из листьев *Alnus japonica* Steud., бензокамфорин H, выделенный из съедобного гриба *Taiwanofungus camphoratus*, ресвератрол из виноградных косточек, сесквитерпеноиды,

выделенные из *Artemisia austroyunnanensis*, и многие другие вещества в исследованиях *in vitro* показали значительную ингибиторную активность в отношении iNOS.

Ингибиторы синтетического происхождения некоторые авторы разделяют по месту связывания с молекулой iNOS на 4 типа [2]:

1 – ингибиторы, связывающиеся с сайтом связывания аргинина;

2 – ингибиторы, имитирующие кофактор тетрагидробиоптерин;

3 – соединения, непосредственно взаимодействующие с гемом молекулы iNOS;

4 – соединения, взаимодействующие с кофакторами кальмодулин или флавинов.

Наиболее многочисленная группа – ингибиторы, связывающиеся с сайтом аргинина, ее разделяют на аналоги L-аргинина и не аналоги L-аргинина, последние состоят из двух групп веществ – амидиновые и гетероциклические соединения [39]. Остановимся на некоторых из них.

Аналоги L-аргинина. L-NMMA (N^G-мометил-L-аргинин) образуется в организме в процессе деградации метилированных по аргинину белков, не селективный ингибитор (подавляет продукцию NO всеми тремя изоформами фермента). Из ряда других ингибиторов это соединение наиболее часто используется в экспериментах, поскольку оно хорошо растворимо в водной среде и растворы стабильны. В форме гидрохлорида имеет наименование «546C88». При введении здоровым добровольцам (3 мг/кг, внутривенно и 0,03–1,0 мг/кг/мин в течение 3 мин внутривенно) снижал частоту сердечных сокращений, ударный объем и, следовательно, сердечный выброс, повышал сосудистое сопротивление и кровяное давление, а также сопротивление легочных сосудов, но не повышал давление в легочной артерии [39].

L-N ω ,N ω -диметиларгинин (часто в литературе его называют асимметрично диметилированным аргинином – ADMA) также является продуктом деградации метилированных по аргинину белков и неселективным ингибитором iNOS [39].

Нефизиологические аминокислоты на основе ацетамидиновых производных лизина и гомолизина, содержащих сульфидную, сульфоксидную или сульфонную часть, были синтезированы и введены в качестве ингибиторов NOS в 90-х гг. XX в. Среди них производное сульфона (2R)-2-амино-3-[[2-(этанамидоиламино) этил]сульфонил]пропановая кислота (в литературе упоминается как GW273629) и сульфидное производное (2S)-2-амино-4-[[2-(этанамидоиламино)этил]тио]бутановой кислоты (в литературе – GW274150) показало селективное действие в отношении рекомбинантной человеческой iNOS [39].

Не аналоги L-аргинина. Наиболее ранний и самый известный селективный ингибитор iNOS – аминугуанидин. В исследованиях на животных аминугуанидин проявлял высокую эффективность: подавлял развитие энцефаломиелита мышей [1], снижал гиперпродукцию NO в экспериментальных инфекционных моделях [40], оказывал антиэкссудативный эффект при воспалении мочевого пузыря у кошек [41], проявлял анальгезирующий эффект [42], предотвращал или снижал морфиновую зависимость [43], предотвращал образование гликозилированных продуктов и нарушение соединительной ткани артериальной стенки у крыс с диабетом [44], значительно снижал эм-

бриональную смерть при аллогенной беременности мышей [45], увеличивал срок выживаемости трансплантата [46], предупреждал индуцированные гипергликемией атеросклеротические изменения при экспериментальной диабетической нефропатии [47], предупреждал различные осложнения диабета [48].

Доклинические исследования аминугуанидина позволили рассматривать его как перспективное средство для предотвращения осложнений диабета, таких как ретинопатия и нефропатия. В разработке лекарственного средства на основе аминугуанидина «Пимагедин», начавшейся в 1989 г., участвовало 2 компании – Marion Merrell Dow и Alteon. Лекарство предполагалось использовать для замедления прогрессирования нефропатии у людей с инсулинозависимым диабетом в клинических исследованиях в США (плановое начало в 1990 г.) и в странах Европы (начало в 1994 г.). Однако в середине 1995 г. компанию Marion Merrell Dow купила компания Hoechst Marion Roussel, которая решила выйти из проекта, что не предполагалось в ходе предварительных соглашений до продажи. Из-за нехватки финансов Alteon остановила все клинические испытания.

Это вызвало скандал в научном сообществе стран Европы, поскольку была уже проведена большая работа по привлечению пациентов. Исследователи – участники многоцентрового исследования обратились с открытым письмом к общественности, опубликованным в журнале «The Lancet» [49], редакция которого поддержала мнение исследователей о недопустимости прерывания начавшегося клинического испытания по причинам, отличным от научных, о чем изложено в редакционной статье с названием «Странное правило остановки от Hoechst Marion Roussel» [50]. Препарат аминугуанидина этим скандалом был опорочен и не увидел дальнейшего развития, хотя, возможно, причины кроются не только в этом.

Пяти- и шестичленные гетероциклические соединения. Обладают селективностью по отношению к iNOS, в экспериментах *in vitro* подавляют продукцию NO, однако дальшей число результатов на моделях патологий пока их разработка не прошла [39].

Клинические испытания ингибиторов iNOS

L-NMMA. Клинические испытания (фаза I/II) по использованию L-NMMA для преодоления резистентного к химиотерапии трижды негативного рака молочной железы [51]. L-NMMA (ингибитор всех трех изоформ NOS) применялся в сочетании с таксаном для лечения 35 пациентов с химиопротективным, местнораспространенным раком молочной железы (LABC) или метастатическим раком молочной железы (TNBC). Общая частота положительного ответа на химиотерапию составила 45,8% (11 из 24): 81,8% (9 из 11) для пациентов с LABC и 15,4% (2 из 13) для пациентов с метастатическим TNBC. Среди пациентов с LABC у трех пациентов был патологический полный ответ на операцию (27,3%). Токсичность \geq 3-й степени была отмечена у 21% пациентов; однако никаких побочных эффектов, связанных с L-NMMA, выявлено не было. У пациентов, ответивших на химиотерапию, наблюдали увеличение количества CD15-позитивных нейтрофилов периферической крови и снижение в биоптатах, полученных после терапии, экспрессии аргиназы (маркера проопухолевого статуса нейтрофилов). Аналогичные обнадеживающие результаты в преодолении резистентности к химиотерапии трижды негативного рака молочной

железы при использовании ингибиторов NOS опубликованы и другими коллективами [52].

Результаты клинических испытаний L-NMMA в лечении септического шока (в дозах 5 мг/кг в час и выше) и кардиогенного шока (в дозе 1 мг/кг в час), сопровождающего инфаркт миокарда, приведены в обзоре [53]. Ингибитор NOS повышал смертность от септического шока, что авторы связывали с вызываемыми им неблагоприятными гемодинамическими изменениями (снижение сердечного выброса, повышение сопротивления легочных сосудов и снижение доставки кислорода тканям). У пациентов с кардиогенным шоком L-NMMA не оказывал никакого положительного действия, что предположительно связано со слишком малой дозой.

Применение 4 различных ингибиторов NOS, среди которых был один ингибитор nNOS и неселективный ингибитор L-NMMA, у 705 пациентов для лечения острой и хронической мигрени в четырех плацебо-контролируемых исследованиях и в одном открытом клиническом исследовании выявило эффективность только у L-NMMA. У селективных ингибиторов GW273629, GW274150 и агониста рецептора 5-HT_{1B/1D} (NXN-188) были не эффективны [54].

Роноптерин. Оценка действия ингибитора NOS роноптерина (аналога тетрагидробиоптерина, VAS203, 10 мг/кг массы тела) на функции почки в двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом перекрестном исследовании I фазы выявила снижение почечной перфузии и функции клубочков в пределах физиологического диапазона, главным образом, из-за сужения сосудов в прегломерулярном участке [55].

GW274150. С 2005 по 2014 г. компания GlaxoSmithKline провела ряд клинических исследований (фазы II) нового селективного ингибитора iNOS по 2 показаниям – мигрень и ревматоидный артрит. Эти исследования не продемонстрировали высокую эффективность GW274150 в сравнении с другими препаратами [1].

Cindunistat (SD-6010). Компания Pfizer провела клинические испытания селективного ингибитора iNOS cindunistat (код SD-6010) при симптоматическом остеоартрите колена. По результатам 2-летнего испытания фазы II было показано, что новый препарат хорошо переносится пациентами, при его приеме отмечено улучшение в течение 48 нед. состояния больных стадии 2, но не отмечено влияния на больных стадии 3 [2].

Заключение

Из тех сотен соединений – ингибиторов NOS, которые были запатентованы до 2015 г., только 4 перешли в клинические испытания, несмотря на доказанную в доклинических исследованиях высокую эффективность в подавлении экспрессии iNOS и положительном влиянии на патологические процессы. При этом из этих четырех только два (GW274150 и Cindunistat) являются селективными ингибиторами iNOS. Однако при этом продолжают появляться публикации, подтверждающие тот факт, что iNOS представляет собой вполне перспективную фармакологическую мишень.

Литература / References

- Cinelli M.A., Do H.T., Miley G.P., Silverman R.B. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. *Med. Res. Rev.* 2020;40(1):158–189. DOI: 10.1002/med.21599.
- Ahmad N., Ansari M.Y., Haqqi T.M. Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J. Cell. Physiol.* 2020;235:6366–6376. DOI: 10.1002/jcp.29607.
- Ferreiro C.R., Chagas A.C.P., Carvalho M.H.C., Dantas A.P., Jatene M.B., Bento De Souza L.C. et al. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation.* 2001;103(18):2272–2276. DOI: 10.1161/01.cir.103.18.2272.
- Navasardyan I., Bonavida V. Regulation of T cells in cancer by nitric oxide. *Cells.* 2021;10:2655. DOI: 10.3390/cells10102655.
- Бельский Ю.П., Бельская Н.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Патрушев В.К., Агафонов В.И. Клетки опухоли Эрлиха стимулируют продукцию интерферона-γ Т-клетками и не чувствительны к аутокринному оксиду азота. *Вопросы онкологии.* 2004;50(6):689–692. [Bel'skiĭ Yu.P., Bel'skaia N.V., Danilets M.G., Trofimova E.S., Patrushev V.K., Agafonov V.I. Ehrlich tumor cells stimulate T-cell production of interferon-gamma and are resistant to autocrine nitric oxide. *Vopr. Oncol.* 2004;50(6):689–692. (In Russ.)].
- Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010;23(2):75–93. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.007.
- Anavia S., Tirosha O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 2020;146:16–35. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411.
- Lirk P., Hoffmann G., Rieder J. Inducible nitric oxide synthase-time for reappraisal. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2002;1(1):89–108. DOI: 10.2174/1568010023344913.
- Данилец М.Г., Бельский Ю.П., Бельская Н.В., Трофимова Е.С., Учасова Е.Г., Агафонов В.И. Экспрессия аргиназы перитонеальными макрофагами и продукция ими оксида азота при Th1- и Th2-зависимом иммунном ответе. *Бюлл. эксперим. биол. и медицины.* 2007;S1:97–100. [Danilets M.G., Bel'skiĭ Yu.P., Bel'skaia N.V., Trofimova E.S., Patrushev V.K., Agafonov V.I. Arginase expression by peritoneal macrophages and their production of nitric oxide in Th1- and Th2-dependent immune responses. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007;S1:97–100. (In Russ.)].
- Nagy G., Koncz A., Telarico T., Fernandez D., Ersek B., Buzás E. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2010;12(3):210. DOI: 10.1186/ar3045.
- Burggraaf S., Bingham J., Payne J., Kimpton W.G., Lowenthal J.W., Bean A.G. Increased inducible nitric oxide synthase expression in organs is associated with a higher severity of H5N1 influenza virus infection. *PLoS One.* 2011;6(1):e14561. DOI: 10.1371/journal.pone.0014561.
- Almeida-Souza F., Souza C., Taniwaki N., Silva J., Oliveira R., Abreu-Silva A.L. et al. Morinda citrifolia Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of Leishmania amazonensis amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. *Nitric Oxide* 2016;58:51–58. DOI: 10.1016/j.niox.2016.06.004.
- Sharma J.N., Al-Omran A., Parvathy S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007;15(6):252–259. DOI: 10.1007/s10787-007-0013-x.
- Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S. et al. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2008;45(1):18–31. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020.
- Szabo C. Gasotransmitters in cancer: From pathophysiology to experimental therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15(3):185–203. DOI: 10.1038/nrd.2015.1.
- Kawasaki K., Smith R.S.Jr., Hsieh C.M., Sun J., Chao J., Liao J.K. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:5726–5737. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5726-5737.2003.
- Olson N., van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide.* 2011;25(2):125–137. DOI: 10.1016/j.niox.2010.12.010.
- Ambros S., Merriam W.G., Bennett W.P., Felley-Bosco E., Ogunfusika M.O., Oser S.M. et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: Implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res.* 1998;58(2):334–341.
- Lee S.W., Choi H., Eun S.Y., Fukuyama S., Croft M. Nitric oxide modulates TGF-beta-directive signals to suppress Foxp3+ regulatory

- T cell differentiation and potentiate Th1 development. *J. Immunol.* 2011;186(12):6972–6980. DOI: 10.4049/jimmunol.1100485.
20. Cinier J., Hubert M., Besson L., Di Roio A., Rodriguez C., Lombardi V. et al. Recruitment and expansion of Tregs cells in the tumor environment-how to target them? *Cancers.* 2021;13(8):1850. DOI: 10.3390/cancers13081850.
 21. Schietinger A., Greenberg P.D. Tolerance and exhaustion: Defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2013;35(2):51–60. DOI: 10.1016/j.it.2013.10.001.
 22. Jiang W., He Y., He W., Wu G., Zhou X., Sheng Q. et al. Exhausted CD8+T cells in the tumor immune microenvironment: new pathways to therapy. *Front. Immunol.* 2021;11:622509. DOI: 10.3389/fimmu.2020.622509.
 23. Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A.H., Piazuelo M.B. et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Canc. Res.* 2004;64(16):5839–5849. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0465.
 24. Parker K.H., Beury D.W., Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Adv. Cancer Res.* 2015;128:95–139. DOI: 10.1016/bs.acr.2015.04.002.
 25. Girotti A.W., Fahey J.F., Korytowski W. Role of nitric oxide in hyper-aggressiveness of tumor cells that survive various anti-cancer therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2022;179:103805. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103805.
 26. Khan F.H., Dervan E., Bhattacharyya D.D., McAuliffe J.D., Miranda K.M., Glynn S.A. The role of nitric oxide in cancer: master regulator of NoT? *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(24):9393. DOI: 10.3390/ijms21249393.
 27. Vannini F., Kashfi K., Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* 2015;6:334–343. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.009.
 28. Somasundaram V., Ridnour L.A., Cheng R.Y., Walke A.J., Kedeei N., Bhattacharyya D.D. et al. Systemic NOS2 depletion and COX inhibition limits TNBC disease progression and alters lymphoid cell spatial orientation and density. *Redox Biol.* 2022;58:102529. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102529.
 29. Miyoshi T., Li Y., Shih D.M., Wang X., Laubach V.E., Matsumoto A.H. et al. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life. Sci.* 2006;79(6):525–531. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.01.043.
 30. Mercanoglu G., Safran N., Ahishali B.B., Uzun H., Yalcin A., Mercanoglu F. Nitric oxide mediated effects of nebulivolol in myocardial infarction: the source of nitric oxide. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2015;19(24):4872–4889.
 31. El-Awady M.S., Suddek G.M. Agmatine ameliorates atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol-fed rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014;66(6):835–843. DOI: 10.1111/jpph.12204.
 32. Chauhan S.D., Seggara G., Vo P.A., Macallister R.J., Hobbs A.J., Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB. J.* 2003;17(6):773–775. DOI: 10.1096/fj.02-0668fje.
 33. Guo Y., Jones W.K., Xuan Y.T., Tang X.L., Bao W., Wu W.J. et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96(20):11507–11512. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11507.
 34. Mungrue I.N., Gros R., You X., Pirani A., Azad A., Csont T. et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J. Clin. Invest.* 2002;109(6):735–743. DOI: 10.1172/JCI13265.
 35. Lind M., Hayesa A., Caprmdab M., Petrovic D., Rodrigod L., Kruzliake P. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed. Pharmacother.* 2017;93:370–375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.
 36. Oliveira-Paula G.H., Lacchini R., Tanus-Santos J.E. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. *Curr. Drug Targets.* 2014;15(2):164–174. DOI: 10.2174/13894501113146660227.
 37. Результаты поиска по запросу: публикации, посвященные ингибиторам NOS за период с 1991 по январь 2023 г. (по данным сайта PubMed). [Search results on demand: publications on NOS inhibitors from 1991 to January 2023 (according to PubMed)]. URL: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%28Nitric+oxide+synthase+inhibitor%5BTitle%5D%29+OR+%28Nitric+oxide+synthase+inhibitors%5BTitle%5D%29+AND+%28%28221900%2F01%2F01%22%5BDate++Publication%5D+%3A+%223000%22%5BDate++Publication%5D%29%29&sort=&fil er=pubt.review&fil er=pubt.review \(02.03.2023\).](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%28Nitric+oxide+synthase+inhibitor%5BTitle%5D%29+OR+%28Nitric+oxide+synthase+inhibitors%5BTitle%5D%29+AND+%28%28221900%2F01%2F01%22%5BDate++Publication%5D+%3A+%223000%22%5BDate++Publication%5D%29%29&sort=&fil er=pubt.review&fil er=pubt.review (02.03.2023).)
 38. Yang Y., Yu T., Lian Y.J., Ma R., Yang S., Cho J.Y. Nitric oxide synthase inhibitors: a review of patents from 2011 to the present. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2015;25(1):49–68. DOI: 10.1517/13543776.2014.979154.
 39. Minhas R., Bansal Y., Bansal G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. *Med. Res. Rev.* 2020;40:823–855. DOI: 10.1002/med.21636.
 40. Sorrells D.L., Friend C., Koltuksuz U., Courcoulas A., Boyle P., Garrett M. et al. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge *in vivo*. *Arch. Surg.* 1996;131(11):1155–1163. DOI: 10.1001/archsurg.1996.01430230037007.
 41. Nilsson B., Delbro D., Hedin L., Conradi N., Thune A., Friman S. et al. Role of nitric oxide in induction of inflammatory fluid secretion by the mucosa of the feline gallbladder. *Gastroenterology.* 1996;110(2):598–606. DOI: 10.1053/gast.1996.v110.pm8566609.
 42. Lu G., Su R.B., Li J., Qin B.Y. Modulation by alpha-difluoromethyl-ornithine and aminoguanidine of pain threshold, morphine analgesia and tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;478(2–3):139–144. DOI: 10.1016/j.ejphar.2003.08.048.
 43. Abdel-Zahera A.O., Hamdya M.M., Alya S.A., Abdel-Hady R.H., Abdel-Rahman S. Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice. *Europ. J. Pharmacol.* 2006;540(1–3):60–66. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.03.059.
 44. Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P., Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986;232(4758):1629–1632. DOI: 10.1126/science.3487117.
 45. Haddad E.K., Duclos A.J., Baines M.G. Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 1995;182(4):1143–1151. DOI: 10.1084/jem.182.4.1143.
 46. Worrall N.K., Lazenby W.D., Misko T.P., Lin T.S., Rodi C.P., Manning P.T. et al. Modulation of *in vivo* alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 1995;181(1):63–70. DOI: 10.1084/jem.181.1.63.
 47. Kihara M., Schmelzer J.D., Poduslo J.F., Curran G.L., Nickander K.K., Low P.A. Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88(14):6107–6111. DOI: 10.1073/pnas.88.14.6107.
 48. Onorato J.M., Jenkins A.J., Thorpe S.R., Baynes J.W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J. Biol. Chem.* 2000;275(28):21177–21184. DOI: 10.1074/jbc.M003263200.
 49. Viberti G., Slama G., Pozza G., Czyzyk A., Bilous R.W., Gries A. et al. Early closure of European Pimagedine trial. Steering Committee. Safety Committee. *The Lancet.* 1997;350(9072):214–215. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)26029-0.
 50. A curious stopping rule from Hoechst Marion Roussel (Editorial). *The Lancet.* 1997;350(9072):155. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)21029-9.
 51. Chung A.W., Anand K., Anselme A.C., Chan A.A., Gupta N., Venta L.A. et al. A phase 1/2 clinical trial of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA and taxane for treating chemoresistant triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 2021;13(624):eabj5070. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj5070.
 52. Dávila-González D., Choi D.S., Rosato R.R., Granados-Principal S.M., Kuhn J.G., Li W.F. et al. Pharmacological inhibition of NOS activates ASK1/JNK pathway augmenting docetaxel-mediated apoptosis in triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2018;24(5):1152–1162. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1437.
 53. Howes L.G., Brillante D.G. Expert opinion on tilarginine in the treatment of shock. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2008;17(10):1573–1580. DOI: 10.1517/13543784.17.10.1573.
 54. Barbanti P., Egeo G., Aurilia C., Fofi L., Della-Morte D. Drugs targeting nitric oxide synthase for migraine treatment. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2014;23(8):1141–1148. DOI: 10.1517/13543784.2014.918953.
 55. Ott C., Bosch A., Winzer N., Friedrich S., Schinzel R., Tegtmeyer F. et al. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor roflumetinol (VAS203) on renal function in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2019;85(5):900–907. DOI: 10.1111/bcp.13870.

Информация о вкладе авторов

Галагудза М.М. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.
Бельский Ю.П. – поиск литературы, анализ и интерпретация данных.

Information on author contributions

Galagudza M.M. – review of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript.
Belsky Yu.P. – literature search, data analysis and interpretation.



Бельская Н.В. – разработка концепции и дизайна публикации, анализ и интерпретация данных.

Belskaya N.V. – development of the concept and design of the publication, analysis and interpretation of data.

Сведения об авторах

Галагудза Михаил Михайлович, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-5129-9944.

E-mail: galagoudza@mail.ru.

Бельский Юрий Павлович, д-р биол. наук, руководитель научно-исследовательского отдела биохимических исследований, Центр доклинических и трансляционных исследований, Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-0365-4873.

E-mail: belsky59@mail.ru.

Бельская Наталия Витальевна, заместитель руководителя Испытательного центра «Центр доклинических исследований», Акционерное общество «Генериум». ORCID 0009-0003-6359-8839.

E-mail: natalybelska@yandex.ru.

 **Бельский Юрий Павлович**, e-mail: belsky59@mail.ru.

Information about the authors

Michael M. Galagudza, Dr. Sci. (Med.), Professor, Associate Member of Russian Academy of Sciences, Head of Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical research Centre. ORCID 0000-0001-5129-9944.

E-mail: galagoudza@mail.ru.

Yury P. Belsky, Dr. Sci. (Biol.), Head of Research Department of Biochemistry, Preclinical Translational Research Centre, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical research Centre. ORCID 0000-0002-0365-4873.

E-mail: belsky59@mail.ru.

Natalia V. Belsky, Deputy Head, Testing Center "Center for Preclinical Research", JSC "Generium". ORCID 0009-0003-6359-8839.

E-mail: natalybelska@yandex.ru.

 **Yury P. Belsky**, e-mail: belsky59@mail.ru.

Received January 30, 2023

Поступила 30.01.2023



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-21-27>
УДК 616.12-008.331-097

Роль иммуно-воспалительных механизмов в патогенезе артериальной гипертонии

**В.Ф. Мордовин, И.В. Зюбанова, М.А. Манукян, И.К. Доржиева,
А.А. Вторушина, С.А. Хунхинова, А.Ю. Фальковская**

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Артериальная гипертония (АГ) остается основным фактором риска сердечно-сосудистых осложнений, несмотря на совершенствование методов фармакотерапии. Это обуславливает необходимость более углубленного изучения патогенетических механизмов заболевания и разработки на этой основе новых методов его лечения. Появляется все больше данных, свидетельствующих о существенной роли иммуно-воспалительных нарушений в патогенезе заболевания. В статье представлены основные современные данные, касающиеся изучения этой проблемы. Подробно проанализированы работы, посвященные роли нарушений клеточных факторов иммунитета, в значительной степени обусловленной их способностью продуцировать провоспалительные цитокины. Особое внимание уделено влиянию современных методов эндоваскулярного лечения на изменения степени выраженности иммуно-воспалительных процессов у пациентов с резистентной к фармакотерапии формой АГ. Обсуждены возможные механизмы терапевтического действия ренальной денервации и перспективы дальнейшего клинического использования данного метода.

Ключевые слова:	артериальная гипертония, хроническое низкоинтенсивное воспаление, цитокины, лимфоциты, клеточный иммунитет.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	источник финансирования: гос. задание НИИК Томского НИМЦ, гос. регистрация: AAA-A15-115123110026-3 от 31.12.2015.
Для цитирования:	Мордовин В.Ф., Зюбанова И.В., Манукян М.А., Доржиева И.К., Вторушина А.А., Хунхинова С.А., Фальковская А.Ю. Роль иммуно-воспалительных механизмов в патогенезе артериальной гипертонии. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):21–27. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-21-27 .

The role of immune-inflammatory mechanisms in the pathogenesis of hypertension

**Victor F. Mordovin, Irina V. Zyubanova, Musheg A. Manukyan,
Irina K. Dorzhieva, Anastasia A. Vtorushina, Simzhit A. Khunkhinova,
Alla Yu. Falkovskaya**

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Abstract

Hypertension remains the main risk factor of cardiovascular diseases despite the improvement of pharmacotherapy methods. This provides rationale for an in-depth study of pathogenetic mechanisms and development of new methods for the treatment of hypertension. There is increasingly more evidence for the essential role of immune-inflammatory disorders in the pathogenesis of hypertension. The article reviews the current state of knowledge on this problem. The authors provide a detailed analysis of the studies focusing on the role of abnormal factors of cellular immunity essentially associated with cell abilities to produce pro-inflammatory cytokines. Particular attention is paid to the effects of state-of-the-art methods of endovascular treatment

✉ Зюбанова Ирина Владимировна, e-mail: zyubanovaiv@mail.ru.

on the changes in degree of severity of immune-inflammatory processes in patients with pharmacotherapy resistant form of hypertension. Possible mechanisms of the therapeutic action of renal denervation and the prospects for further clinical use of this method are discussed.

Keywords:	hypertension, chronic low-intensity inflammation, cytokines, lymphocytes, cellular immunity.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was supported in a framework of state assignment for Cardiology Research Institute of Tomsk NRCM (state registration # AAAA-A15-115123110026-3 from December 31, 2015).
For citation:	Mordovin V.F., Zyubanova I.V., Manukyan M.A., Dorzhieva I.K., Vtorushina A.A., Khunkhinova S.A., Falkovskaya A.Yu. The role of immune-inflammatory mechanisms in the pathogenesis of hypertension. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):21–27. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-21-27 .

Артериальная гипертензия (АГ) является основным фактором риска сердечно-сосудистых осложнений, затрагивающим 30–40% населения и вызывающим 7,5 млн случаев смерти во всем мире, несмотря на совершенствование методов гипотензивной терапии. В связи с этим особое внимание заслуживают данные, свидетельствующие о том, что в механизмах развития этого заболевания существенное значение имеет повышение активности иммуно-воспалительных процессов [1–4].

Первые сообщения о роли иммунных факторов в развитии АГ относятся к 1972 г., когда у людей с различными причинами заболевания было обнаружено воспаление сосудов, проявлявшееся клеточной инфильтрацией монулекарными клетками, проникающими с поверхности эндотелия сосудов в среднюю оболочку и адвентицию [5].

Последующие многочисленные исследования убедительно подтвердили значимую роль клеточных факторов иммунитета в развитии АГ. Т-лимфоциты и моноциты/макрофаги, накапливаясь в адвентиции сосудов и их периваскулярном пространстве, селезенке, а также в мозговом и корковом веществе почек, обладают способностью продуцировать провоспалительные цитокины, непосредственно участвующие в патогенезе АГ вследствие выраженного влияния на функцию сосудов и почек [6–10].

Особенно большое значение в последние годы придается провоспалительной активности периваскулярной жировой ткани (ПЖТ), состоящей из адипоцитов, преадипоцитов, мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов и воспалительных клеток, обладающих способностью увеличивать секрецию моноцитами, лейкоцитами и макрофагами фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкинов (ИЛ) 6 и 12, а также эндотелина 1, следствием чего является развитие сосудистого фиброза и повышение сосудистой жесткости [11–13].

Предполагается, что основной участок начального воспаления при гипертензии находится в пределах ПЖТ на ее границе с адвентицией [14]. Воспаление ПЖТ приводит к возникновению сосудистой дисфункции, повышению периферического сосудистого сопротивления и возникновению АГ. В развитии этих процессов существенное значение придается провоспалительным цитокинам ИЛ-6 и 17, а также ФНО, продуцируемыми набором CD4+ Т-клеток, некоторых В-клеток и НКТ-клеток естественных киллеров [15–20].

Значительное повышение уровня ИЛ-17 в сыворотке крови обнаружено не только у пациентов с АГ, но также и у людей с предгипертензией, причем возрастание его уровня сопровождалось дальнейшим увеличением показателей артериального давления (АД), а сохранение

повышенных уровней АД оказывало самостоятельное стимулирующее влияние на уровни ИЛ-17 в сыворотке крови. Следует отметить, что при проведении этого исследования когорты пациентов с предгипертензией была разделена на квартили Q1 ($\leq 3,5$ нг/л), Q2 (от 3,60 до 6,10 нг/л), Q3 (от 6,20 до 10,00 нг/л) и Q4 ($\geq 10,10$ нг/л) на основе уровней ИЛ-17. В группах Q2 и Q4 отношение шансов наличия предгипертензии было выше по сравнению с группой Q1. Исходя из этого, авторы делают достаточно обоснованное заключение, что повышенный сывороточный уровень ИЛ-17 связан с предгипертензией, при этом его повышение сопровождалось возрастанием уровня систолического АД [21].

Механизмы участия ИЛ-17 в патогенезе АГ продолжают изучаться [22–24]. С клинической точки зрения важно отметить связь повышения уровней провоспалительных цитокинов с увеличением степени гипертензии, развитием патологических изменений органов-мишеней, в том числе формированием диастолической дисфункции и гипертрофии левого желудочка, независимо от уровней АД [25–28].

Кроме того, обнаружена значимая связь между уровнями ИЛ-6 и показателями эндотелиальной дисфункции коронарных артерий у пациентов с АГ. В этом исследовании определение миокардиального кровотока проводили с помощью позитронно-эмиссионной томографии в покое и во время холодной прессорной пробы, при этом коронарное сосудистое сопротивление использовалось как маркер функции коронарного эндотелия. В результате этого исследования было отмечено значительно более выраженное повышение показателей коронарного сосудистого сопротивления у пациентов с АГ по сравнению со здоровыми лицами, которое, кроме того, коррелировало с уровнями ИЛ-6 ($r = 0,46$; $p < 0,02$) и ФНО- α ($r = 0,39$; $p < 0,05$) [29]. На этой основе разрабатываются новые подходы к лечению острых коронарных синдромов [30].

Не менее существенное значение в механизмах формирования АГ имеет возрастание уровня провоспалительного цитокина ФНО [31–34].

Значительный интерес в этой связи представляют появившиеся в последние годы данные, свидетельствующие о том, что значительную роль при этом играет фермент, превращающий ФНО- α TACE, также известный как ADAM17 (disintegrin and metalloproteinase domain 17 в зарубежной литературе или дезинтегрин металлопротеаза 17 – в переводе). Его основное значение заключается в отщеплении мембранного фрагмента ФНО и переводе этого цитокина в растворимое состояние, поэтому ранее он обозначался как ФНО-конвертирующий фермент [35].

Важно отметить, что среди > 80 связанных с мембранной молекул, расщепленных ADAM17, выявлена дисрегуляция иммунологических цитокинов ФНО- α , интерферона- γ , трансформирующего фактора роста- β , ИЛ-4, 1 β , 13 и рецепторов цитокинов, вызывающих воспаление [36].

Хроническая активация ренин-ангиотензиновой системы и повышенное связывание ангиотензина-II (Ang-II) с рецептором Ang-II типа 1 является ключевым механизмом, ведущим к активации ADAM17, способствующей воспалению и развитию АГ [37]. Происходящее при этом повышение уровня ADAM17 в головном мозге приводит к возникновению симпатической гиперактивации и развитию нейрогенной гипертензии [38].

Обнаружено также, что Ang-II и проренин увеличивают выработку провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β , 6 и ФНО- α при одновременном снижении продукции ИЛ-10 в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и ростральном вентральном латеральном отделе продолговатого мозга, тем самым дополнительно повышая опосредованный ADAM17 вклад воспалительных цитокинов в возрастание симпатического вазомоторного тонуса и развитие АГ [39]. В связи с этим можно отметить выявленные противовоспалительные эффекты ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, с которыми связывают как выраженный антигипертензивный эффект, так и улучшение эластических свойств сосудов на фоне терапии лизиноприлом у пациентов с АГ в сочетании с ревматоидным артритом [40].

Таким образом, имеются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что провоспалительные цитокины являются значимым компонентом патофизиологии АГ и связаны с возникновением органных осложнений этого заболевания [39]. В этой связи особого внимания заслуживает тот факт, что динамика изменений их содержания в крови в значительной степени определяется изменениями показателей активности вегетативной нервной системы [40].

Основное значение в активации иммунной системы придается повышению активности симпатической нервной системы, что может формироваться на стадии предгипертензии и определяет последующее прогрессирование заболевания [41, 42].

На этой основе сформулирована концепция, согласно которой не только ситуационное, стресс-индуцированное, но и длительно сохраняющееся повышение уровней АД является следствием возрастания активности симпатической нервной системы, реализуемое через повышение активности иммуно-воспалительных процессов. Дополнительным подтверждением обоснованности этой концепции являются данные, свидетельствующие о том, что гипотензивная активность парасимпатической нервной системы ассоциирована с ее угнетающим влиянием на выраженность иммуно-воспалительных процессов [43, 44].

Аналогичное подавление иммуно-воспалительной активности, согласно экспериментальным исследованиям, достигается с помощью эндovasкулярного воздействия на локальные компоненты симпатической нервной системы. В клинике с этой целью все более широко используется проведение катетерной симпатической денервации почечных артерий.

Первые результаты использования этого метода SYMPLICITY HTN1 и 2 продемонстрировали двукратное снижение офисных показателей АД [45], однако много-

центровое рандомизированное шам-контролируемое исследование SYMPLICITY HTN 3 не выявило дополнительных преимуществ при использовании этого метода по сравнению с медикаментозной терапией [46].

Post-hoc анализ исследования SYMPLICITY HTN3 выявил его значительные недостатки, такие как неадекватная техника аблации, неоднородный опыт операторов в проведении вмешательства, частые неконтролируемые изменения в назначенной антигипертензивной терапии. Последующие исследования, проводившиеся с улучшенным дизайном и усовершенствованным, анатомически оптимизированным способом выполнения процедуры в дистальных отделах почечных артерий, подтвердили ее гипотензивную эффективность [47–51].

Не менее важно отметить, что проведение ренальной денервации (РД) оказывает выраженное органопротективное действие. Использование эхокардиографии выявило снижение массы миокарда левого желудочка через 6 мес. на 6,9% ($p = 0,015$) и индекса массы миокарда левого желудочка на 5,5% ($p = 0,020$). По данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) объем субэндокардиального повреждения миокарда уменьшался через 6 мес. на 29% ($p = 0,031$), через 12 мес. на 41,4% ($p = 0,008$), а масса миокарда левого желудочка статистически значимо регрессировала через 12 мес. на 18,3% ($p = 0,008$) [52].

Весьма примечательно, что уменьшение объема субэндокардиального повреждения миокарда происходило при использовании метода дистальной денервации и не наблюдалось при использовании стандартной методики с воздействием в основных ветвях почечных артерий [53].

При проведении метаанализа 17 основных исследований были получены аналогичные результаты, показавшие, что под влиянием РД происходило уменьшение массы миокарда на 14,17 г (95% ДИ от –18,33 до –10,01; $p < 0,001$) и на 4,75 г (95% ДИ от –7,83 до –1,67; $p = 0,003$) по данным эхокардиографии и МРТ соответственно [54].

Механизмы терапевтической эффективности РД остаются недостаточно изученными. Ранее были получены данные, согласно которым значительное снижение уровней АД под влиянием процедуры сопровождается понижением уровней моноцитарного хемотаксического белка-1, ИЛ-6, 1 β и 12, а также ФНО- α через 3 и 6 мес. после вмешательства [55, 56].

При изучении отдаленных результатов РД было обнаружено, что снижение концентраций С-реактивного белка (СРБ), альдостерона и активного ренина сохраняется на протяжении 2 лет после оперативного лечения и ассоциируется с уменьшением массы миокарда левого желудочка. Весьма примечательным было отсутствие корреляции регрессии гипертрофии левого желудочка со степенью снижения АД, что свидетельствует о прямом кардиопротективном действии РД [57].

Следует также отметить, что статистически значимое снижение АД и уровней ФНО- α и СРБ под влиянием РД сопровождалось повышением содержания в крови адипонектина и лептина, а изменение уровней ФНО- α было связано со снижением вариабельности систолического АД, тогда как изменение уровней СРБ, адипонектина и лептина не зависело от степени антигипертензивного эффекта вмешательства [58].

У пациентов с АГ и ишемической болезнью сердца наблюдалась только тенденция к снижению уровней АД и СРБ, при этом у больных с наиболее выраженным коронарным атеросклерозом исходно наблюдались более

высокие уровни ФНО- α , а антигипертензивное действие РД у них было менее выражено [59].

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что в течение длительного времени вопросы нейрогуморального и иммуно-воспалительного взаимодействия были предметом изучения специалистов в области клинической патофизиологии. Вместе с тем в результате значительного прогресса в определении роли этих процессов

в механизмах формирования АГ изучение этих вопросов перестало быть предметом только теоретических исследований и стало основой для разработки и внедрения в клиническую практику новых перспективных, высокотехнологичных и патофизиологически обоснованных методов лечения этого заболевания, проводимых с использованием эндovasкулярного воздействия на локальные компоненты симпатической нервной системы.

References

1. Norlander A.E., Madhur M.S., Harrison D.G. The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.* 2018;215(1):21–33. DOI: 10.1084/jem.20171773.
2. Satou R., Penrose H., Navar L.G. Inflammation as a regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018;20(12):100. DOI: 10.1007/s11906-018-0900-0.
3. Jayedi A., Rahimi K., Bautista L.E., Nazarzadeh M., Zargar M.S., Shab-Bidar S. Inflammation markers and risk of developing hypertension: a meta-analysis of cohort studies. *Heart.* 2019;105(9):686–692. DOI: 10.1136/heartjnl-2018-314216.
4. Khan S.I., Andrews K.L., Jennings G.L., Sampson A.K., Chin-Dusting J.P.F. Y chromosome, hypertension and cardiovascular disease: Is inflammation the answer? *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(12):2892. DOI: 10.3390/ijms20122892.
5. Olsen F. Inflammatory cellular reaction in hypertensive vascular disease in man. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* 1972;80(2):253–256.
6. Вострикова Н.В., Фёдоров Д.В., Климова Е.Е., Бишевский К.М. Прогностическая значимость маркеров воспаления (С-реактивный белок и интерлейкин-6) при артериальной гипертензии. *Бюллетень медицинской науки.* 2019;1(13):4345. [Vostrikova N.V., Fyodorov D.V., Klimova E.E., Bishovsky K.M. Prognostic importance of inflammation markers (c-reactive protein and interleukin-6) in patients with arterial hypertension. *Bulletin of Medical Science.* 2019;1(13):39–41. (In Russ.). DOI: 10.31684/2541-8475.2019.1(13).43-45.
7. Ясюкайт Н.В., Павлова О.С. Роль воспаления и оксидативного стресса в развитии артериальной гипертензии. *Кардиология в Беларуси.* 2021;13(4):608615. [Yasiukaits N., Pavlova O. Role of Inflammation and Oxidative Stress in the Development of Arterial Hypertension. *Cardiology in Belarus.* 2021;13(4):608–615. (In Russ.). DOI: 10.34883/Pl.2021.13.4.009.
8. Tanase D.M., Gosav E.M., Radu S., Ouatu A., Rezus C., Ciocoiu M. et al. Arterial hypertension and interleukins: Potential therapeutic target or future diagnostic marker? *Int. J. Hypertens.* 2019;3159283. DOI: 10.1155/2019/3159283.
9. Wen Y., Crowley S.D. Renal effects of cytokines in hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1165:443–454. DOI: 10.1007/978-981-13-8871-2_21.
10. Caillon A., Paradis P., Schiffrin E.L. Role of immune cells in hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2019;176(12):1818–1828. DOI: 10.1111/bph.14427.
11. Петелина Т.И., Авдеева К.С., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Леонович С.В., Зуева Е.В. и др. Биохимические параметры в диагностике поражения органов-мишеней у пациентов с артериальной гипертензией и абдоминальным ожирением. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2019;8(3):60–60. [Petelina T.I., Avdeeva K.S., Musikhina N.A., Gapon L.I., Leonovich S.V., Zueva E.V., Valeeva L.L. Biochemical parameters in the diagnosis of target organ damage in patients with hypertension and abdominal obesity. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2019;8(3):60–60. (In Russ.). DOI: 10.17802/2306-1278.
12. Nosalski R., Guzik T.J. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br. J. Pharmacol.* 2017;174(20):3496–3513. DOI: 10.1111/bph.13705.
13. Queiroz M., Sena C.M. Perivascular adipose tissue in age-related vascular disease. *Ageing Res. Rev.* 2020;59:101040. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101040.
14. Mikolajczyk T.P., Nosalski R., Szczepaniak P., Budzyn K., Osmenda G., Skiba D. et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *The FASEB J.* 2016;30(5):1987–1999. DOI: 10.1096/fj.201500088R.
15. Кологривова И.В., Кошельская О.А., Сулова Т.Е., Винницкая И.В., Кравченко Е.С., Трубачева О.А. Взаимосвязь факторов воспаления и метаболических параметров при ожирении у пациентов с артериальной гипертензией высокого и очень высокого риска. *Российский кардиологический журнал.* 2018;5:27–33. [Kologrivova I.V., Koshelskaya O.A., Suslova T.E., Vinnitskaya I.V., Kravchenko E.S., Trubacheva O.A. Interplay of inflammation and metabolic factors in comorbid obesity and arterial hypertension of high and very high risk. *Russian Journal of Cardiology.* 2018;(5):27–33. (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2018-5-27-33.
16. Тимашева Я.Р. Иммунологические аспекты эссенциальной гипертензии. *Медицинская иммунология.* 2019;21(3):407–418. [Timasheva Y.R. Immunological aspects of essential hypertension. *Medical Immunology.* 2019;21(3):407–418. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-407-418.
17. Журавлёва Л.В., Куликова М.В. Роль воспаления в развитии метаболических нарушений у пациентов с артериальной гипертензией. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2019;34(3):45–52. [Zhuravlyova L.V., Kulikova M.V. The role of inflammation in the development of metabolic disorders in patients with arterial hypertension. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2019;34(3):45–52. (In Russ.). DOI: 10.29001/2073-8552-2019-34-3-45-52.
18. Guzik T.J., Skiba D.S., Touyz R.M., Harrison D.G. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc. Res.* 2017;113(9):1009–1023. DOI: 10.1093/cvr/cvx108.
19. Simundic T., Jelakovic B., Dzumhur A., Turk T., Sahinovic I., Dobrosecvic B. et al. Interleukin 17A and toll-like receptor 4 in patients with arterial hypertension. *Kidney Blood Pres. Res.* 2017;42(1):99–108. DOI: 10.1159/000471900.
20. Shao Y., Saredy J., Yang W.Y., Sun Y., Lu Y., Saaoud F. et al. Vascular endothelial cells and innate immunity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020;40(6):138–152. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314330.
21. Yao W., Sun Y., Wang X., Niu K. Elevated serum level of interleukin 17 in a population of prehypertension. *J. Clin. Hypertens.* 2015;17(10):770–774. DOI: 10.1111/jch.12612.
22. Patrick D.M., Van Beusecum J.P., Kirabo A. The role of inflammation in hypertension: novel concepts. *Curr. Opin. Physiol.* 2021;19:92–98. DOI: 10.1016/j.cophys.2020.09.016.
23. Welsh P., Grassia G., Botha S., Sattar N., Maffia P. Targeting inflammation to reduce cardiovascular disease risk: a realistic clinical prospect? *Br. J. Pharmacol.* 2017;174(22):3898–3913. DOI: 10.1111/bph.13818.
24. Maranduca M.A., Tanase D.M., Branisteanu D.C., Serban D.N., Branisteanu D.E., Serban I.L. Involvement of proinflammatory cytokines in angiotensin II-induced hypertension in rat. *Exp. Ther. Med.* 2020;20(4):3541–3545. DOI: 10.3892/etm.2020.9100.
25. Xiao L., Harrison D.G. Inflammation in hypertension. *Can. J. Cardiol.* 2020;36(5):635–647. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.01.013.
26. Полупанов А.Г., Залова Т.Б., Рысмазова Ф.Т., Дуйшеналиева М.Т., Романова Т.А., Джумагулова А.С. Взаимосвязь концентрации фактора некроза опухоли альфа и интерлейкина-10 с развитием фатальных и нефатальных осложнений у больных эссенциальной гипертензией в процессе среднесрочного наблюдения. *Артериальная гипертензия.* 2019;25(5):540–548. [Polupanov A.G., Zalova T.B., Rysmatova F.T., Duishenalieva M.T., Romanova T.A., Dzhumagulova A.S. Relationship of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 with the development of fatal and non-fatal complications in patients with essential hypertension during mid-term follow-up. *Arterial Hypertension.* 2019;25(5):540–548. (In Russ.). DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-540-548.
27. Хараева З.Ф., Хоконова Т.М., Камбачокова З.А., Барокова Е.Б., Накова Л.В. Сывороточные значения цитокинов у пациентов с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018;63(10):626–629. [Kharaeva Z.F., Khokonova T.M., Cambazola Z.A., Barakova E.B., Na-

- kova L.V. Serum values of cytokines in patients with ischemic heart disease and arterial hypertension. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(10):626–629. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-626-629.
28. Small H.Y., Migliarino S., Czesnikiewicz-Guzik M., Guzik T.J. Hypertension: Focus on autoimmunity and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2018;125:104–115. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.085.
29. Naya M., Tsukamoto T., Morita K., Kato C., Furumoto T., Fujii S. et al. Plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha can predict coronary endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Hypertens. Res.* 2007;30(6):541–548. DOI: 10.1291/hypres.30.541.
30. Цой Е.И., Вышлов Е.В., Трусов В.Б. Применение полипренолсодержащего препарата у пациентов с острым коронарным синдромом. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2018;33(2):21–25.
[Tsoi E.I., Vyshlov E.V., Trusov V.B. The using of polyprenol-containing drug in patients with acute coronary syndrome. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018;33(2):21–25. (In Russ.). DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-2-21-25.
31. Loperena R., Van Beusecum J.P., Itani H.A., Engel N., Laroumanie F., Xiao L. et al. Hypertension and increased endothelial mechanical stretch promote monocyte differentiation and activation: roles of STAT3, interleukin 6 and hydrogen peroxide. *Cardiovasc. Res.* 2018;114(11):1547–1563. DOI: 10.1093/cvr/cvy112.
32. Полозова Э.И., Пузанова Е.В., Сеськина А.А. Роль иммунологических нарушений, эндотелиальной дисфункции и гемостатических расстройств в генезе артериальной гипертензии при метаболическом синдроме. *Медицинская иммунология*. 2020;22(2):221–230.
[Polozova E.I., Puzanova E.V., Seskina A.A. Role of immunological disorders, endothelial dysfunction and hemostatic disorders in the genesis of arterial hypertension in the metabolic syndrome. *Medical Immunology*. 2020;22(2):221–230. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-ROI-1926.
33. Радаева О.А., Симбирцев А.С. Особенности циркадианных ритмов синтеза цитокинов у больных эссенциальной артериальной гипертензией. *Российский иммунологический журнал*. 2018;12(4):730–732.
[Radaeva O.A., Simbircev A.S. Peculiarities of cytokine synthesis circadian rhythms in patients with essential arterial hypertension. *Russian Journal of Immunology*. 2018;12(4):730–732. (In Russ.). DOI: 10.31857/S102872210002655-5.
34. Drummond G.R., Vinh A., Guzik T.J., Sobey C.G. Immune mechanisms of hypertension. *Nat. Rev. Immunol.* 2019;19(8):517–532. DOI: 10.1038/s41577-019-0160-5.
35. Groth E., Pruessmeyer J., Babendreyer A., Schumacher J., Pasqualon T., Dreytmueller D. et al. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016;1863(11):2795–2808. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.002.
36. Zunke F., Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta*. 2017;1864(11):2059–2070. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.07.001.
37. Mukerjee S., Gao H., Xu J., Sato R., Zsombok A., Lazartigues E. ACE2 and ADAM17 interaction regulates the activity of presympathetic neurons. *Hypertension*. 2019;74(5):1181–1191. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13133.
38. Xu J., Molinas A.J.R., Mukerjee S., Morgan D.A., Rahmouni K., Zsombok A. et al. Activation of ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) on glutamatergic neurons selectively promotes sympathoexcitation. *Hypertension*. 2019;73(6):1266–1274. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12832.
39. Dominguez-Garcia S., Castro C., Geribaldi-Doldan N. ADAM17/TACE: A key molecule in brain injury regeneration. *Neural Regen. Res.* 2019;14(8):1378–1379. DOI: 10.4103/1673-5374.253517.
40. Саркисова О.Л., Реброва Н.В., Богомолова И.И., Анисимова Е.А., Карпов Р.С., Мордовин В.Ф. и др. Влияние лизиноприла на показатели суточного мониторирования артериального давления и сосудистую жесткость у больных артериальной гипертензией в сочетании с ревматоидным артритом. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2017;13(5):661–666.
[Sarkisova O.L., Rebrova N.V., Bogomolova I.I., Anisimova E.A., Karpov R.S., Mordovin V.F. et al. Effect of lisinopril on 24-hour blood pressure and arterial stiffness in patients with arterial hypertension and rheumatoid arthritis. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2017;13(5):661–666. (In Russ.). DOI: 10.20996/1819-6446-2017-13-5-661-666.
41. Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Орлова Н.В., Хавка Н.Н., Горяйнова С.В., Хорева М.В. и др. Изучение цитокинового профиля у мужчин с артериальной гипертензией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;63(7):439–444.
[Chukaeva I.I., Gankovskaya L.V., Orlova N.V., Havka N.N., Goryaynova S.V., Khoreva M.V. et al. Study of cytokine profile in men with hypertension. *Russian clinical laboratory diagnostics*. 2018;63(7):439–444. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-7-439-444.
42. Chavan S.S., Pavlov V.A., Tracey K.J. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity*. 2017;46(6):927–942. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.008.
43. Reardon C., Murray K., Lomax A.E. Neuroimmune communication in health and disease. *Physiol. Rev.* 2018;98(4):2287–2316. DOI: 10.1152/physrev.00035.2017.
44. Carnevale D. Neural control of immunity in hypertension: Council on hypertension mid career award for research excellence. *Hypertension*. 2020;76(3):622–628. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14637.
45. Carnevale D., Perrotta M., Pallante F., Fardella V., Iacobucci R., Fardella S. et al. A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. *Nat. Commun.* 2016;7:13035. DOI: 10.1038/ncomms13035.
46. Ramos-Martinez I.E., Rodriguez M.C., Cerbon M., Ramos-Martinez J.C., Ramos-Martinez E.G. Role of the cholinergic anti-inflammatory reflex in central nervous system diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13427. DOI: 10.3390/ijms222413427.
47. Esler M.D., Krum H., Sobotka P.A., Schlaich M.P., Schmieder R.E., Böhm M. et al. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9756):1903–1909. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62039-9.
48. Bhatt D.L., Kandzari D.E., O'Neill W.W., D'Agostino R., Flack J.M., Katzen B.T. et al. A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(15):1393–1401. DOI: 10.1056/NEJMoa1402670.
49. Пекарский С.Е., Баев А.Е., Фальковская А.Ю., Ситкова Е.С., Зюбанова И.В., Личикаки В.А. и др. Анатомически оптимизированная дистальная ренальная денервация стойкий гипотензивный эффект в течение 3 лет после вмешательства. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2020;24(3S):98–107.
[Pekarskiy S.E., Baev A.E., Falkovskaya A.Yu., Sitkova E.S., Zyubanova I.V., Lichikaki V.A. et al. Anatomically optimized distal renal denervation sustained blood pressure lowering efficacy during 3 years after the intervention. *Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2020;24(3S):98–107. (In Russ.). DOI: 10.21688/1681-3472-2020-3S-98-107.
50. Kandzari D.E., Böhm M., Mahfoud F., Townsend R.R., Weber M.A., Pocock S. et al. Effect of renal denervation on blood pressure in the presence of antihypertensive drugs: 6-month efficacy and safety results from the SPYRAL HTN-ON MED proof-of-concept randomised trial. *Lancet*. 2018;391(10137):2346–2355. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30951-6.
51. Azizi M., Schmieder R.E., Mahfoud F., Weber M.A., Daemen J., Davies J. et al. Endovascular ultrasound renal denervation to treat hypertension (RADIANCE-HTN SOLO): A multicentre, international, single-blind, randomised, sham-controlled trial. *Lancet*. 2018;391(10137):2335–2345. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31082-1.
52. Townsend R.R., Mahfoud F., Kandzari D.E., Kario K., Pocock S., Weber M.A. et al. Catheter-based renal denervation in patients with uncontrolled hypertension in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED): A randomised, sham-controlled, proof-of-concept trial. *Lancet*. 2017;390(10108):2160–2170. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32281-X.
53. Mahfoud F., Mancia G., Schmieder R., Narkiewicz K., Ruilope L., Schlaich M. et al. Renal denervation in high-risk patients with hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020;75(23):2879–2888. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.04.036.
54. Ситкова Е.С., Мордовин В.Ф., Рипп Т.М., Пекарский С.Е., Рябова Т.Р., Личикаки В.А. и др. Положительное влияние ренальной денервации на гипертрофию и субэндокардиальное повреждение миокарда. *Артериальная гипертензия*. 2019;25(1):46–59.
[Sitkova E.S., Mordovin V.F., Ripp T.M., Pekarskiy S.E., Ryabova T.R., Lichikaki V.A., Falkovskaya A.Yu., Mochula O.V., Usov V.Yu., Baev A.E. Positive effects of renal denervation on left ventricular hypertrophy and subendocardial damage. *Arterial Hypertension*. 2019;25(1):46–59. (In Russ.). DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-1-46-59.
55. Ситкова Е.С., Мордовин В.Ф., Пекарский С.Е., Рипп Т.М., Фальковская А.Ю., Личикаки В.А. и др. Дистальная ренальная денервация: возможности кардиопротекции у пациентов с резистентной артериальной гипертензией. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(4):225.

- [Sitkova E.S., Mordovin V.F., Pekarsky S.E., Ripp T.M., Falkovskaya A.Yu., Lichikaki V.A., Zyubanova I.V., Baev A.E., Ryabova T.R., Mochula O.V., Usov V.Yu. Distal renal denervation: cardioprotection in patients with resistant hypertension. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(4):2225. (In Russ.).] DOI: 10.15829/1728-8800-2019-2225.
56. Kordalis A., Tsiachris D., Pietri P., Tsioufis C., Stefanadis C. Regression of organ damage following renal denervation in resistant hypertension: a meta-analysis. *J. Hypertens.* 2018;36(8):1614–1621. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001798.
57. Зюбанова И.В., Мордовин В.Ф., Пекарский С.Е., Рипп Т.М., Фальковская А.Ю., Личикаки В.А. и др. Возможные механизмы отдаленных кардиальных эффектов ренальной денервации. *Артериальная гипертензия*. 2019;25 (4):423–432. [Zyubanova I.V., Mordovin V.F., Pekarskiy S.E., Ripp T.M., Falkovskaya A.Yu., Lichikaki V.A. et al. Possible mechanisms of renal denervation long-term cardiac effects. *Arterial Hypertension*. 2019;25(4):423–432. (In Russ.).] DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-4-423-432.
58. Фальковская А.Ю., Мордовин В.Ф., Пекарский С.Е., Рипп Т.М., Личикаки В.А., Ситкова Е.С. и др. Влияние ренальной денервации на уровень адипокинов и провоспалительный статус у больных резистентной артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2019;34(4):118–127. [Falkovskaya A.Yu., Mordovin V.F., Pekarskiy S.E., Ripp T.M., Lichikaki V.A., Sitkova E.S. et al. The effects of renal denervation on adipokines and pro-inflammatory status in patients with resistant arterial hypertension associated with type 2 diabetes mellitus. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2019;34(4):118–127. (In Russ.).] DOI: 10.29001/2073-8552-2019-34-4-118–127.
59. Зюбанова И.В., Мордовин В.Ф., Пекарский С.Е., Рипп Т.М., Фальковская А.Ю., Личикаки В.А. и др. Особенности динамики артериального давления и провоспалительных маркеров после ренальной денервации у пациентов с резистентной артериальной гипертензией и различным течением коронарного атеросклероза. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2020;35(1):28–37. [Zyubanova I.V., Mordovin V.F., Pekarskiy S.E., Ripp T.M., Falkovskaya A.Yu., Lichikaki V.A. et al. Blood pressure and proinflammatory marker dynamics after renal denervation in patients with resistant hypertension and various severity of coronary atherosclerosis. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2020;35(1):28–37. (In Russ.).] DOI: 10.29001/2073-8552-2020-35-1-28-37.

Информация о вкладе авторов

Мордовин В.Ф. – выбор концепции статьи, подбор литературных источников, написание текста статьи, утверждение окончательного варианта.

Зюбанова И.В. – подбор литературных источников, написание текста статьи, утверждение окончательного варианта.

Манукян М.А. – подбор литературных источников, редактирование текста статьи, утверждение окончательного варианта.

Доржиева И.К. – редактирование текста статьи, утверждение окончательного варианта.

Вторушина А.А. – редактирование текста статьи, утверждение окончательного варианта.

Хунхинова С.А. – редактирование текста статьи, утверждение окончательного варианта.

Фальковская А.Ю. – выбор концепции статьи, подбор литературных источников, утверждение окончательного варианта.

Information on author contributions

Mordovin V.F. – choice of article concept, selection of literature sources, writing the manuscript, and approval of the final version of manuscript for publication.

Zyubanova I.V. – selection of literature sources, writing the manuscript, and approval of the final version of manuscript for publication.

Manukyan M.A. – selection of literature sources, manuscript revision, and approval of the final version of manuscript for publication.

Dorzhieva I.K. – manuscript revision and approval of the final version of manuscript for publication.

Vtorushina A.A. – manuscript revision and approval of the final version of manuscript for publication.

Khunkhinova S.A. – manuscript revision and approval of the final version of manuscript for publication.

Falkovskaya A.Yu. – choice of article concept, selection of literary sources, and approval of the final version of manuscript for publication.

Сведения об авторах

Мордовин Виктор Фёдорович, д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник, отделение артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-2238-4573.

E-mail: mordovin@cardio-tomsk.ru.

Зюбанова Ирина Владимировна, канд. мед. наук, научный сотрудник, отделение артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-6995-9875.

E-mail: zyubanovaiv@mail.ru.

Манукян Мушег Айкович, младший научный сотрудник, отделение артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-3577-1895.

E-mail: manukyan.musheg@yandex.ru.

Доржиева Ирина Кимовна, клинический ординатор, отделение артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-2781-7662.

E-mail: kimrin001@gmail.com.

Вторушина Анастасия Анатольевна, клинический ординатор, отделение артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-1192-0489.

E-mail: nastusa@mail.2000.ru.

Information about the authors

Victor F. Mordovin, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Research Scientist, Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-2238-4573.

E-mail: mordovin@cardio-tomsk.ru.

Irina V. Zyubanova, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-6995-9875.

E-mail: zyubanovaiv@mail.ru.

Musheg A. Manukyan, Junior Research Scientist, Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-3577-1895.

E-mail: manukyan.musheg@yandex.ru.

Irina K. Dorzhieva, Clinical Resident, Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-2781-7662.

E-mail: kimrin001@gmail.com.

Anastasia A. Vtorushina, Clinical Resident, Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-1192-0489.

E-mail: nastusa@mail.2000.ru.

Simzhit A. Khunkhinova, Clinical Resident, Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,

Хунхинова Симжит Андреевна, клинический ординатор, отделение артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-5000-4216.

E-mail: hsa@cardio-tomsk.ru.

Фальковская Алла Юрьевна, д-р мед. наук, заведующий отделением артериальных гипертензий, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-5638-3034.

E-mail: mordovin@cardio-tomsk.ru.

 **Зюбанова Ирина Владимировна**, e-mail: zyubanovaiv@mail.ru.

Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-5000-4216.

E-mail: hsa@cardio-tomsk.ru.

Alla Yu. Falkovskaya, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Hypertension, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-5638-3034.

E-mail: mordovin@cardio-tomsk.ru.

 **Irina V. Zyubanova**, e-mail: zyubanovaiv@mail.ru.

Received April 01, 2022

Поступила 01.04.2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-28-36>
УДК 616.1-02:577.125

Церамиды: взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний

Е.В. Белик, Ю.А. Дылева, О.В. Груздева

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Аннотация

Несмотря на достигнутые успехи, ведущей причиной смертности во всем мире остаются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). С помощью традиционных факторов риска не всегда возможно выявить всех пациентов с высокой вероятностью развития сердечно-сосудистых событий (ССС), поэтому до сих пор остается актуальной проблема поиска новых биомаркеров ССЗ. Ранее проведенные исследования показали важную роль избыточного синтеза церамидов в развитии ожирения, инсулинорезистентности (ИР), сахарного диабета 2-го типа (СД2), стеатоза печени. Считается, что церамиды способны модулировать сигнальные пути, участвующие в регуляции метаболизма глюкозы, синтеза триацилглицеролов (ТАГ), развитии апоптоза, фиброза и атеросклероза. Учитывая широкий спектр метаболических эффектов, изучение церамидов является перспективным для выявления пациентов высокого риска ССЗ и улучшения существующих лечебно-диагностических стратегий. В этой обзорной статье рассмотрена роль церамидов в развитии атеросклероза, взаимосвязь с традиционными факторами риска, а также возможность их использования в качестве новых факторов риска для ранней диагностики ССЗ.

Ключевые слова:	церамиды, факторы риска, сердечно-сосудистые заболевания, курение.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено в рамках Комплексной научно-технической программы полного инновационного цикла «Разработка и внедрение комплекса технологий в области разведки и добычи твердых полезных ископаемых, обеспечения промышленной безопасности, биоремедиации, создания новых продуктов глубокой переработки из угольного сырья при последовательном снижении экологической нагрузки на окружающую среду и рисков для жизни населения» (утв. Распоряжением Правительства РФ от 11 мая 2022 г. № 1144-р).
Для цитирования:	Белик Е.В., Дылева Ю.А., Груздева О.В. Церамиды: взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):28–36. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-28-36 .

Ceramides: correlation with cardiovascular risk factors

Ekaterina V. Belik, Yulia A. Dyleva, Olga V. Gruzdeva

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6, Sosnovy bulvar, Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Despite the successes achieved, cardiovascular disease (CVD) remains the leading cause of death worldwide. With the help of traditional risk factors, it is not always possible to identify all patients with a high probability of developing cardiovascular events (CVE); therefore, the problem of finding new CVD biomarkers still remains relevant. Previous studies have shown the important role of excessive synthesis of ceramides in the development of obesity, insulin resistance (IR), type 2 diabetes mellitus (DM2), and liver steatosis. It is considered that ceramides are able to modulate signaling pathways involved in the regulation of glucose metabolism, triglyceride synthesis, development of apoptosis, fibrosis, and atherosclerosis. Given the wide range of metabolic effects, the study of ceramides is promising for identifying patients at high risk of CVD, as well as improving existing treatment and diagnostic strategies. This review article considers the role of ceramides in the development of atherosclerosis, the correlation with traditional risk factors, and the possibility of using them as new risk factors for early diagnosis of CVD.

Белик Екатерина Владимировна, e-mail: sionina.ev@mail.ru.

Keywords:	ceramides, risk factors, cardiovascular disease, smoking.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	the study was carried out within the framework of the Comprehensive Scientific and Technical Program of the full innovation cycle "Development and implementation of a set of technologies in the field of exploration and production of solid minerals, ensuring industrial safety, bioremediation, creating new products of deep processing from coal raw materials while consistently reducing the environmental impact on the environment and risks for the life of the population" (approved by Order of the Government of the Russian Federation of May 11, 2022 No. 1144-r).
For citation:	Belik E.V., Dyleva Y.A., Gruzdeva O.V. Ceramides: correlation with cardiovascular risk factors. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):28–36. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-28-36 .

Введение

В настоящее время ведется активный поиск новых биомаркеров и терапевтических мишеней с целью разработки эффективных подходов к стратификации риска и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1]. Начиная с середины прошлого века, основной частью расчета кардиометаболического риска является анализ липидного профиля крови [2]. Хотя определение содержания общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой (ХС-ЛПВП), низкой (ХС-ЛПНП), очень низкой плотности (ХС-ЛПОНП) и триацилглицеролов (ТАГ) обеспечивает приемлемую оценку сердечно-сосудистого риска [3], появляются данные, что церамиды лучше предсказывают кардиометаболические исходы не только у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), но и у здоровых лиц [4–6].

Первоначально клинические исследования церамидов были направлены на выявление пациентов высокого риска среди лиц с установленной ИБС в целях вторичной профилактики [7, 8]. Имеются немногочисленные исследования циркулирующих уровней церамидов у практически здоровых людей, что важно для первичной профилактики ССЗ. Так, при изучении взаимосвязи церамидов с неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями (ССС) у практически здоровых лиц в рамках исследования FINRISK 2002 были количественно определены циркулирующие уровни церамидов C(d18:1/16:0), C(d18:1/18:0), C(d18:1/24:0), C(d18:1/18:0), C(d18:1/24:1) в 8101 образце сыворотки мужчин и женщин в возрасте 25–74 лет (сред-

ний возраст - 48,5 лет, 53% - женщины). В течение 13 лет наблюдения у 813 пациентов произошли неблагоприятные ССС, 116 из которых закончились летальным исходом. У лиц, перенесших неблагоприятное ССС, наблюдалось повышение концентрации изучаемых церамидов и их соотношений. При этом церамиды C(d18:1/18:0) имели наибольшую связь с риском развития ССС (отношение шансов - ОШ) 1,31, 95% доверительный интервал (ДИ): 1,21–1,41) даже после корректировки на традиционные факторы риска (ОШ 1,21, 95% ДИ: 1,11–1,33) [9].

V.C. Vasile и соавт. проанализировали данные 1131 человека старше 45 лет (64 ± 9 лет, 52% - женщины) без установленных ССЗ, набранных из общей популяции, используя систему Rochester Epidemiology Project (REP). За время наблюдения в течение 13,3 (12,7; 14,4) лет у 486 лиц развились ССС. Обнаружено, что соотношения церамидов (C(16:0)/(24:0), C(18:0)/(24:0) и C(24:1)/(24:0)) связаны с риском развития неблагоприятных ССС независимо от ХС-ЛПНП и традиционных факторов риска ИБС [10].

Известно, что церамиды являются биологически активными липидами, которые регулируют многие ферменты, такие как киназы и фосфатазы, модулируют сигнальные пути метаболизма глюкозы и синтеза ТАГ. Помимо физиологических эффектов церамиды способны индуцировать воспаление и апоптоз, развитие фиброза и атеросклероза [11]. Краткая характеристика роли избытка церамидов в формировании атеросклероза приведена в таблице.

Таблица. Роль церамидов в формировании атеросклероза

Table. The role of ceramides in atherosclerosis

Типовой патологический процесс Typical pathologic process	Основные механизмы Basic mechanisms	Ссылки References
Липотоксичность Lipotoxicity	Избыточное содержание церамидов приводит к неспособности адипоцитов депонировать питательные вещества An excess of ceramides leads to the inability of adipocytes to store nutrients.	33, 50
Эндотелиальная дисфункция Endothelial dysfunction	Увеличение концентрации церамидов вызывает снижение биодоступности NO An increase in the concentration of ceramides causes a decrease in NO bioavailability	38
Воспаление Inflammation	Повышенные уровни церамидов способствуют формированию воспалительного микроокружения (лейкоциты, эритроциты, липиды) и увеличению продукции цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, TNF-α) и СРБ, которые индуцируют воспаление Elevated levels of ceramides contribute to the formation of an inflammatory microenvironment (leukocytes, erythrocytes, lipids) and an increase in the production of cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) and CRP, which induce inflammation	50, 52
Гипоксия Hypoxia	Увеличение концентрации церамидов активирует HIF, который стимулирует активацию ПОЛ и образование новых сосудов (<i>vasa vasorum</i>) в атеросклеротических бляшках An increase in the concentration of ceramides activates HIF, which stimulates the activation of LPO and the formation of new vessels (<i>vasa vasorum</i>) in atherosclerotic plaques.	50

Окончание табл. 1
End of table 1

Окислительный стресс Oxidative stress	Избыток керамидов способствует повышению проницаемости клеточных мембран, развитию митохондриальной дисфункции, ингибированию промежуточных звеньев электронной транспортной цепи, накоплению активных повреждающих агентов (свободных радикалов, прооксидантов, активных форм кислорода) и апоптозу An excess of ceramides causes an increase in the permeability of cell membranes, the development of mitochondrial dysfunction, inhibition of intermediate links in the electron transport chain, the accumulation of active damaging agents (free radicals, prooxidants, reactive oxygen species) and apoptosis.	50
Нарушение обмена/секреции адипокинов Impaired metabolism/secretion of adipokines	Повышенный уровень керамидов – снижает уровень адипонектина, который катализирует деацелирование керамидов посредством активации церамидазы – снижает содержание лептина, подавляющего синтез керамидов через вегетативную нервную систему и за счет репрессии SPT, ограничивающего синтез керамидов <i>de novo</i> – снижает FGF21, стимулирующий высвобождение адипонектина из адипоцитов Elevated ceramides level – reduces the level of adiponectin, which catalyzes the deacylation of ceramides through the activation of ceramidase – reduces leptin, which suppresses the synthesis of ceramides through the autonomic nervous system and due to the repression of SPT, which limits the synthesis of ceramides <i>de novo</i> – reduces FGF21, which stimulates the release of adiponectin from adipocytes	50, 52

Примечание: ИЛ-1β – интерлейкин-1β, ИЛ-6 – интерлейкин-6, ПОЛ – перекисное окисление липидов, СРБ – С-реактивный белок, HIF – гипоксией индуцируемый фактор, NO – оксид азота, TNF-α – фактора некроза опухоли α, SPT – серинпальмитойлтрансфераза, FGF21 – фактор роста фибробластов 21.

Note: IL-1β – interleukin-1β, IL-6 – interleukin-6, LPO – lipid peroxidation, CRP – C-reactive protein, HIF – hypoxia inducible factor, NO – nitric oxide, TNF-α – tumor necrosis factor α, SPT – serine palmitoyltransferase, FGF21 – fibroblast growth factor 21.

Избыточное депонирование керамидов в печени и мышцах инициирует инсулинорезистентность (ИР), в кардиомиоцитах – нарушение функций митохондрий, липотоксической кардиомиопатии и сердечной недостаточности (СН) [12]. Однако данные о патогенетической роли керамидов в развитии ССЗ немногочисленны. Учитывая широкий спектр эффектов, изучение керамидов является перспективным для выявления пациентов высокого риска развития ССЗ, а также улучшения существующих диагностических и терапевтических стратегий.

Церамиды как потенциальные факторы риска ССЗ

Церамиды, как и холестерол (ХС), вырабатываются во всех тканях и клетках организма. Однако концентрация циркулирующих керамидов в 1000 раз ниже, поэтому их точная количественная оценка была невозможна до появления специфических методов анализа [13]. Предполагается, что сывороточный пул керамидов формируется благодаря вкладу нескольких тканей, в том числе печени, жировой, мышечной, эндотелия сосудов [14]. Подобно ХС керамиды в кровотоке транспортируются в основном в виде липопротеиновых комплексов: около 80% переносятся ЛПОНП и ЛПНП, 15% – альбумином, 5% – ЛПВП. При этом ЛПНП и ЛПОНП содержат схожие пропорции определенных видов керамидов (меньше С16:0 и больше С24:0), тогда как ЛПВП, наоборот (больше С16:0 и меньше С24:0). Церамиды могут транспортироваться из адипоцитов и эндотелиальных клеток в экзосомах [15]. Увеличение содержания керамидов способствует инфильтрации ЛПНП в эндотелий сосудов, агрегации в интиме, удержанию ЛПНП и усиленному поглощению ХС-ЛПНП макрофагами [16]. Наблюдаемые изменения не зависят от размера ЛПНП или их количества и нивелируются при снижении концентрации керамидов ферментативными ингибиторами (например, мириоцином) или генетической аблацией ферментов синтеза керамидов [17].

Определение уровня ХС и его фракций различными методами широко используется во всем мире, а анализ

липидного профиля крови является основным методом выявления пациентов с риском атерогенных ССЗ [13]. Наличие ассоциаций между керамидами и ССС послужило основой для изучения уровней керамидов в зависимости от факторов риска атеросклероза, в частности ХС и липопротеинов. При обследовании жителей Японии в возрасте $60,7 \pm 1,2$ лет, участвовавших в ежегодной программе проверки здоровья в Kisii ($n = 100$), показана положительная корреляция общего уровня керамидов с ОХС ($r = 0,65; p < 0,01$), ТАГ ($r = 0,44; p < 0,01$) и фосфолипидами ($r = 0,66; p < 0,01$), но не с ХС-ЛПВП [18].

Анализ ассоциаций между сфинголипидами плазмы и кинетикой липопротеинов у мужчин с метаболическим синдромом ($n = 12$, возраст - $48,6 \pm 8,5$ лет, индекс массы тела – $33,8 \pm 5,1$ кг/м²) после лечения розувастатином выявил значительную положительную взаимосвязь между общим содержанием керамидов в плазме и концентрацией аполипопротеина В-100 (апоВ-100) ЛПОНП ($r = 0,58; p < 0,05$) и отрицательную – с фракционной скоростью катаболизма апоВ-100 ЛПОНП ($r = -0,67; p = 0,03$) [19].

В работах, посвященных изучению взаимосвязи между керамидами и ХС, а также его фракциями, определяли общие (суммарные) концентрации керамидов в плазме людей. Однако анализ общего количества керамидов не является эффективным методом диагностики, поскольку керамиды гетерогенны по своему составу и могут включать различные жирные кислоты с переменной длиной цепи и насыщенностью [20]. Поэтому возникла необходимость установления отдельных видов керамидов и их соотношений. Для этих целей была применена жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС). ЖХ-МС/МС представляет собой метод аналитической химии, сочетающий возможности физического разделения ЖХ и МС, где индивидуальные преимущества усиливаются синергически, тогда как ЖХ разделяет смеси с несколькими компонентами, МС (разделение ионизированных частиц по величине отношения массы к заряду) предоставляет спектральную информацию, которая может помочь идентифицировать/подтвердить предполагаемую иден-

тичность каждого разделенного компонента. Метод предназначен для анализа смесей труднолетучих, полярных веществ, не поддающихся анализу методом газожидкостной хроматографии [21].

Определение липидов при помощи ЖХ-МС/МС имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими методами: одновременный анализ множества целевых соединений в большом количестве образцов; уникальная специфичность, позволяющая идентифицировать липиды на уровне молекулярных видов в сложных смесях с широким диапазоном концентраций; возможность точного количественного анализа малых молекул; высокая достоверность, несмотря на присутствие метаболитов; отсутствие помех от сопутствующих и эндогенных веществ, находящихся в плазме крови пациентов [22]. Однако данные методы сложны в исполнении, чем, вероятно, объясняется длительность изучения церамидов в роли маркеров кардиометаболических патологий. Крупные клинические исследования этого класса липидов, открытого еще в XIX в., не проводились до XXI в. [13].

Первоначально корреляции между уровнями церамидов и ССЗ обнаружены на моделях экспериментальных животных. В 2005 г. было показано, что ингибирование биосинтеза церамидов *de novo* у мышей ApoE-KO (с нокаутом аполипопротеина E) предотвращает развитие атеросклеротических поражений. С этого времени изучение роли церамидов в развитии ССЗ с использованием фармакологических воздействий или трансгенных мышей приобрело особую актуальность [23]. Однозначного ответа на вопрос, когда проведены первые исследования, посвященные анализу церамидов у людей при ССЗ, нет. Однако в 2006 г. были опубликованы результаты анализа взаимосвязи между плазменным уровнем церамидов и факторами риска атеросклероза у людей. Основными церамидами плазмы были C24:0 и C24:1, их концентрация значительно коррелировала с ОХС и ТАГ, на основании чего высказано предположение о возможности рассматривать церамиды в качестве факторов риска на ранних стадиях атеросклероза [18]. Затем был проведен липидомный анализ плазмы при стабильной и нестабильной ИБС, показавший отрицательную взаимосвязь церамидов с короткой цепью, особенно C14:0, C16:1 и C16:2, с нестабильной ИБС (по сравнению со стабильной ИБС), тогда как церамиды с более длинной цепью, особенно C20:3 и C20:4, были положительно связаны со стабильной ИБС (по сравнению с контролем) [24].

Использование ЖХ-МС/МС позволило определить плазменные уровни церамидов у людей: референтные диапазоны составляют 0,26–0,34 мкмоль/л для церамидов C16:0; 0,09–0,14 мкмоль/л для церамидов C18:0 и 0,96–1,35 мкмоль/л для церамидов C24:1 [6]. Определяющим фактором для реализации физиологических и патологических свойств церамидов считается длина либо сфингоидной, либо N-ацильной цепи [25]. Высокие концентрации церамидов, несущих более длинные жирные кислоты, были связаны со сниженным риском смертности. Так, ОШ общей смертности для каждого вида церамидов составили: 1,89 (95% ДИ: 1,65–2,17) для C16:0; 0,79 (95% ДИ: 0,70–0,88) для C22:0; 0,74 (95% ДИ: 0,65–0,84) для C24:0; 2,51 (95% ДИ: 2,01–3,14) для сфингомилина (SM)-16:0, 0,68 (95% ДИ: 0,58–0,79) для SM-20:0, 0,57 (95% ДИ: 0,49–0,67) для SM-22:0 и 0,66 (0,57–0,75) для SM-24:0. Взаимосвязи церамидов C20:0 с риском смертности обнаружено не было [26].

Особого внимания заслуживают результаты клинических исследований, свидетельствующие о том, что прогностическая значимость церамидов в отношении сердечно-сосудистой смертности у пациентов со стабильной ИБС и острым коронарным синдромом (ОКС) выше, чем ХС и его фракции. В исследовании Sorogene, включавшем пациентов со стабильной ИБС ($n = 160$), такие маркеры, как ХС-ЛПНП и количество частиц ЛПНП существенно не отличались между пациентами, перенесшими коронарную смерть, и контрольной группой (которые остались живы). Но уровни плазменных церамидов между группами значимо различались ($p < 0,001$). С помощью логистического регрессионного анализа было установлено, что соотношение церамидов C(d18:1/16:0)/C(d18:1/24:0) является предиктором коронарной смерти: ОШ 10,33 (95% ДИ: 3,69–28,97). При этом ОШ церамидов оставалось прогностически значимым после корректировки на ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, ОХС, ТАГ и С-реактивный белок (СРБ), что свидетельствует о независимости церамидов от традиционных липидных маркеров [4].

Анализ плазменного уровня церамидов активно используется в повседневной частной и государственной практике клинических учреждений Финляндии и Mayo Clinic в США [2]. Высказано предположение, что идентификация пациентов высокого риска ССЗ на основе церамидов скоро станет повсеместной, так как церамиды являются эффективными холестерин-независимыми биомаркерами широкого спектра кардиометаболических заболеваний. Так, R. Laaksonen и соавт. изучали прогностическую ценность церамидов плазмы в качестве маркеров смерти от ССЗ в трех независимых когортах пациентов со стабильной ИБС и пациентов с ОКС высокого риска. Кроме церамидов (C16:0, C18:0, C24:0 и C24:1) авторы определяли множественные липидные биомаркеры и СРБ. Первая когорта представляла собой пациентов со стабильной ИБС ($n = 160$) из исследования Sorogene. Затем связь между церамидами и высоким риском сердечно-сосудистой смертности была изучена в исследовании Special Program University Medicine-Inflammation in Acute Coronary Syndromes (SPUM-ACS) ($n = 1637$). После этого результаты были подтверждены в Bergen Coronary Angiography Cohort (BECAC), проспективном норвежском когортном исследовании пациентов со стабильной ИБС ($n = 1580$). Оценка годового риска развития ССС в течение 1–5 лет рассчитывалась следующим образом: концентрации церамидов (C16:0, C18:0, C24:1) и их отношение к C24:0 пациента сравнивали с показателями всей исследуемой популяции. Если переменная относилась к первому и второму квартилям, пациент получал 0 баллов, если к третьему квартилю – +1 балл, если к четвертому квартилю – +2 балла. Итоговый результат составлял от 0 до 12 баллов, на его основе пациенты были разделены на категории риска: 0–2 – низкий, 3–6 – умеренный, 7–9 – промежуточный и 10–12 – высокий. При сравнении категорий высокого и низкого риска отмечалось увеличение риска в 4,2 и 6,0 раз у пациентов со стабильной ИБС и ОКС соответственно. Введение поправки на уровень ХС и липопротеинов не влияло на прогностическую ценность церамидов [4]. Полученные данные легли в основу разработки шкалы риска коронарных событий 1 (Cardiovascular Event Risk Test 1 – CERT1) на основе концентраций церамидов C(18:1;2/16:0), C(18:1; 2/18:0), C(18:1/24:1) и их отношений к C(18:1;2/24:0) [27]. Поскольку CERT1 эффективна у пациентов, принимавших статины, считается, что

она способна оценить остаточный риск ССС [2]. Так как фосфатидилхолины (ФХ) показали прогностическую ценность в отношении риска развития ССС, было высказано предположение о возможности улучшения шкалы CERT1 при добавлении к ней отдельных ФХ [28]. Основными критериями при выборе видов липидов были аналитическая стабильность, возможность включения в существующую шкалу CERT1 и статистическая достоверность в ряде клинических когорт. Добавление некоторых специфических видов ФХ привело к разработке шкалы CERT2, основанной на отношении церамидов C(18:1;2/24:1) к C(18:1;2/24:0), C(18:1;2/16:0) к C(16:0/22:5), C(18:1;2/16:0) к ФХ (14:0/22:6) и концентрации ФХ 16:0/16:0 [5].

Показано, что CERT2 может использоваться для выявления пациентов высокого риска у лиц со стабильной ИБС, эффективного прогнозирования остаточных ССС у пациентов с ИБС и риска сердечно-сосудистой смертности у лиц с ОКС независимо от наличия факторов риска. В крупномасштабном исследовании STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy, $n = 11222$) риск по шкале CERT2 был связан с курением, многососудистым поражением коронарного русла и маркерами воспаления (высокочувствительным СРБ и интерлейкином-6 – IL-6), что позволяет предположить способность церамидов отражать воспаление сосудов. Эти данные свидетельствуют о способности шкалы CERT2 отражать как количество бляшек, так и остаточный риск воспаления у пациентов со стабильной ИБС. Более высокий балл CERT2 был связан с повышенными концентрациями высокочувствительного тропонина Т и NT-proBNP (N-концевой натрийуретический пептид про-В-типа), что указывает на взаимосвязь церамидов с повреждениями миокарда и/или его дисфункцией [29].

Продемонстрировано превосходство шкал CERT1 и CERT2 над шкалой SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation) в отношении прогнозирования ССС, смертности от ССЗ и общей смертности у пациентов с ССЗ, при этом CERT2 демонстрирует лучшие результаты, чем CERT1. Прогностическая эффективность CERT2 повышалась в сочетании с SCORE, недавно обновленной до SCORE2, на основании чего предлагается включить определение церамидов и ФХ в следующую версию SCORE [30].

Помимо шкал CERT1 и CERT2 недавно был предложен новый подход к выявлению связи между уровнями церамидов и ИБС с помощью машинного обучения – методов искусственного интеллекта, характерной чертой которых является не прямое решение задачи, а обучение в процессе применения решений множества сходных задач. А.М. Poss и соавт. выполнили таргетную липидомику образцов сыворотки людей с семейной ИБС ($n = 462$) и группы контроля ($n = 212$) для поиска сфинголипидов, связанных с ИБС [31]. Определение уровней 32 сфинголипидов, включая основные церамиды [C(d18:1)], дигидроцерамиды [дигидро-C(d18:0)], глюкозилцерамиды [(глюкозил-C(d18:1))], дигидросфингомиелины [дигидро-SM(d18:0)], сфингомиелины [SM(d18:1)], сфинганин и сфингозин, показало, что практически все они были повышены у пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой. На основании полученных результатов разработана шкала риска ИБС, включающая сфинголипиды – SIC (sphingolipid-inclusive CAD), стратифицирующая пациентов с ИБС более эффективно, чем традиционные клинические биомаркеры ССЗ (ЛПНП и ТАГ) [28]. Одна-

ко у проведенного исследования имеются ограничения: отсутствие когорты для проверки шкалы SIC – образцы пациентов и контрольной группы собирались в разные моменты времени с разницей в 10 лет (в 1980-х и 1990-х гг.). За это время образ жизни и пищевые привычки людей значительно изменились. Кроме того, длительное хранение может негативно влиять на качество образцов и достоверность полученных результатов, несмотря на данные исследований о стабильности сфинголипидов при хранении в течение 16 лет после сбора образцов и нескольких циклов замораживания – оттаивания [32].

Несмотря на физиологические функции церамидов, такие как снижение концентрации свободных жирных кислот за счет накопления жира, их избыток может оказывать повреждающее воздействие на сердечно-сосудистую систему и индуцировать развитие метаболических осложнений [33]. Учитывая ассоциацию ССЗ, СД2 с циркулирующими уровнями церамидов, предложено использовать церамиды в качестве новых биомаркеров для прогнозирования риска развития ССЗ [34]. Однако необходимо учитывать, что на концентрацию церамидов влияют возраст, пол, физическая активность, циркадные ритмы, диетические предпочтения, лекарственные средства и особенности образа жизни [2].

Церамиды и традиционные факторы сердечно-сосудистого риска

В связи с растущим интересом в области изучения и понимания роли церамидов в развитии заболеваний возникает необходимость их количественной оценки и применения полученных знаний в клинических и популяционных исследованиях. По сравнению с другими липидами (ХС и ТАГ) данные о различиях на популяционном уровне, о внутри- и межиндивидуальных изменениях уровней церамидов в зависимости от возраста, пола, расовой принадлежности и сопутствующих заболеваний весьма немногочисленны. Однако такая информация актуальна для фундаментальной и клинической медицины, поскольку может служить теоретической основой для дальнейших исследований. Далее приведены сведения о взаимосвязи церамидов и традиционных факторов сердечно-сосудистого риска.

1. Возраст

Возраст входит в большинство шкал оценки риска развития ССЗ, используемых на сегодняшний день в клинической практике. Несомненно, возраст является мощным показателем для прогнозирования риска в целом, но может ограничивать начало лечения у лиц молодого и среднего возраста. Пожилые пациенты, напротив, могут иметь относительно низкий риск ССЗ, поэтому для своевременного выявления пациентов высокого риска ведется активное изучение взаимосвязи уровней церамидов и возраста [2].

Ранее проведенные исследования свидетельствуют об увеличении циркулирующих уровней церамидов с возрастом [14, 35]. В исследовании The Cardiovascular Health Study, включавшем когорту взрослых старше 65 лет (2145 человек, 41% - мужчины), выявлены более высокие уровни церамидов у пожилых участников. Увеличение концентраций церамидов C16:0 было ассоциировано с повышенным риском смертности. При количественном определении плазменных уровней церамидов у 992 человек старше 55 лет, включенных в Baltimore Longitudinal

Study of Aging (BLSA), было показано увеличение концентрации церамидов в плазме с возрастом. За некоторыми лицами проводилось наблюдение в течение 38 лет, что позволило авторам оценить меж- и внутрииндивидуальные изменения концентраций циркулирующих церамидов в течение длительного времени. Уровни дигидроцерамидов (C20:0 и C24:0), являющихся предшественниками церамидов и обладающих независимыми биологическими эффектами, также увеличивались с возрастом [36]. В другом исследовании с участием 164 человек 19–80 лет (84 женщины) также была выявлена положительная взаимосвязь между уровнями циркулирующих церамидов и возрастом [35].

Предполагается, что одной из причин наблюдаемой взаимосвязи является репрессия церамидами теломераз – ключевых ферментов, участвующих в регуляции клеточного старения. Показано, что церамиды деацетилируют эпигенетические факторы промотора теломеразы (обратной транскриптазы (каталитической единицы теломеразы) в клетках аденокарциномы легких человека, вызывая быстрое старение [37]. При измерении общего количества церамидов при помощи киназного анализа было показано, что уровни церамидов положительно коррелируют с повышенной активацией фосфатаз и сфингомиелиназ в артериях и эндотелии старых крыс (33 мес.). Увеличение церамидов в эндотелии старых крыс может быть связано с возрастной потерей вазомоторной функции, которая ведет к повышенной ригидности сосудов и является основным признаком сердечно-сосудистого старения [38].

2. Пол

Хотя до сих пор нет единого мнения о различиях в уровнях церамидов у мужчин и женщин, в некоторых исследованиях сообщается о положительной корреляции между церамидами и возрастом у женщин в постменопаузе [35, 39].

При изучении различий церамидов в исследовании San Antonio Family Heart Study (SAFHS) ($n = 1076$; 39,1% – мужчины, возраст – 15–91 год) показано, что для мужчин характерны более высокие уровни церамидов в плазме, чем для женщин. Анализ подвидов церамидов выявил, что наблюдаемое увеличение обусловлено длинноцепочечными видами церамидов (C22:0, C24:0 и C24:1) [36]. Однако другими авторами показано, что концентрации церамидов у здоровых женщин превышают таковые у мужчин [40]. S.M. Hamad и соавт. также обнаружили, что уровни церамидов (C18:0 и C22:0) и дигидроцерамидов (C24:0) у женщин были значительно выше, чем у мужчин [41].

При изучении взаимосвязи пола и концентрации церамидов в плазме крови у участников BLSA в возрасте 55–94 лет показано, что у женщин наблюдались повышенные плазменные уровни большинства видов церамидов, дигидроцерамидов и более резкие траектории возрастного увеличения по сравнению с мужчинами. Единственным исключением были церамиды C26:0, которые с возрастом снижались у женщин и увеличивались у мужчин. При этом концентрации церамидов C24:0 были ниже у женщин, чем у мужчин, а уровни церамидов C16:0 были ниже у женщин, чем у мужчин в возрасте 55–64 лет, но выше у женщин в возрасте 65–74 лет [36]. Возможным объяснением может быть обратная корреляция эстрадиола с C(d18:1/24:1) у женщин. Показано, что при инкубации с эстрадиолом

(10 нМ, 24 ч) снижается накопление церамидов в раковых клетках, экспрессирующих рецепторы эстрогена, что подтверждает гипотезу о наличии тесной взаимосвязи между уровнями церамидов и эстрадиола [35].

Предполагается, что одной из причин наблюдаемых различий является более высокое содержание ЛПВП у женщин до определенного возраста по сравнению с мужчинами, что способствует повышению церамидов у женщин [42]. Однако необходимо проведение дальнейших исследований для изучения половозрастных различий уровней церамидов.

3. Артериальная гипертензия

Артериальная гипертензия (АГ) также является причиной инфаркта миокарда (ИМ), гипертрофической кардиомиопатии и СН [43]. Положительные ассоциации между церамидами и артериальным давлением (АД) были обнаружены как в экспериментах на животных, так и в клинических исследованиях у людей [14].

При изучении потенциальной роли церамидов в развитии АГ у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) выявлено повышение АД и эндотелий-зависимая вазоконстрикция, чего не наблюдалось у нормотензивных крыс Wistar-Kyoto (WKY). Проведенный липидный анализ показал более высокий уровень церамидов в изолированных сонных артериях крыс SHR по сравнению с WKY (691 ± 42 против 419 ± 27 пмоль; $p < 0,05$). Значительное увеличение общего количества церамидов было связано с C16:0, C18:0 и C24:1. Выявленные изменения нашли свое отражение в повышении плазменных уровней церамидов у крыс SHR по сравнению с WKY (645 ± 25 против 513 ± 19 пмоль; $p < 0,05$). Возрастание уровня церамидов в плазме было связано с увеличением содержания церамидов C16:0, C22:0, C24:1 и C24:0. Затем проводилось количественное определение церамидов в плазме крови человека. Образцы крови были взяты у людей с нормальным АД (АД $< 140/90$ мм рт. ст.), у пациентов с АГ 1-й стадии (АД $140–159/90–99$ мм рт. ст.) и с эссенциальной АГ 2–3-й стадии (АД $\geq 160/100$ мм рт. ст.). Продемонстрировано значительное повышение уровней церамидов у пациентов с эссенциальной АГ 2–3-й стадии по сравнению со здоровыми лицами с нормальным АД ($243,2 \pm 23,5$ против $183,2 \pm 11,1$ пмоль соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, уровни церамидов коррелировали с увеличением степени тяжести АГ. При этом показатели лиц с АГ 1-й стадии были промежуточными по сравнению с нормотониками и гипертониками 2–3-й стадии. Наблюдаемое увеличение содержания церамидов в плазме пациентов с АГ в основном было обусловлено повышением церамидов C24:1 и C24:0 [44].

В исследовании Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors ($n = 504$) было показано, что церамиды плазмы ассоциированы с изменениями диастолического АД [45]. В The San Antonio Family Heart Study (SAFHS), включавшем 1192 человека из 42 мексиканско-американских семей, выявлена взаимосвязь плазменных уровней церамидов не только с диастолическим, но и с систолическим и средним АД, а также с риском развития АГ [46].

Установлено, что снижение АД часто сопровождается уменьшением уровня церамидов. Так, содержание церамидов в кровеносных сосудах снижается при применении антагониста рецептора ангиотензина II – лозартана или сосудорасширяющего средства – гидралазина [47].

Исследование метаболизма сыворотки, основанной на ЖХ-МС/МС, показало, что эффект снижения АД ункарией (*Uncaia*) у крыс со спонтанной гипертензией зависит от уровня церамидов [48]. Кроме того, предполагается, что отрицательная корреляция между потреблением цельных зерен, рыбьего жира и АД может быть обусловлена уровнем церамидов [49].

4. Ожирение

Изменения уровня церамидов выявлены при различных патологических процессах, таких как ожирение, ИР, воспаление сосудов и атеросклероз [50, 51]. Показано, что повышенный уровень циркулирующих церамидов у людей приводит к их накоплению в различных типах тканей, особенно в жировой ткани (ЖТ) [52]. Единого мнения относительно причин наблюдаемого не существует. Одни авторы считают, что пока ЖТ способна аккумулировать ТАГ в результате гипертрофии (увеличения размера) и/или гиперплазии (увеличения количества) адипоцитов, развитие метаболических нарушений сдерживается. При ожирении эта функция ЖТ нарушается, происходит распространение промежуточных липидных метаболитов, в том числе церамидов, в кровотоки, что ведет к их эктопическому отложению в тканях, не предназначенных для хранения липидов. Развивается липотоксичность, вызывающая ряд клеточных дисфункций, лежащих в основе различных кардиометаболических заболеваний [50].

По мнению других авторов, наблюдаемые изменения могут отражать адаптивные, а не дезадаптивные механизмы, используемые для нивелирования липотоксичности. Вероятно, при хронических метаболических нарушениях и ожирении происходит искажение реакций, предназначенных для адаптации, в результате чего церамиды приобретают токсические свойства. Поэтому липотоксические эффекты церамидов предлагается рассматривать с точки зрения нарушения метаболизма, происходящего из-за дисрегуляции церамидов, а не исходно неблагоприятных эффектов церамидов [53].

Известно, что на синтез и накопление церамидов влияет множество факторов: избыток субстратов, системное воспаление низкой степени активности, окислительный стресс и даже микробиом. Так, омега-3 и добавки с клетчаткой уменьшали содержание церамидов в плазме, что было связано со снижением количества *Colinsella* и увеличением количества *Bifidobacterium* и *Sporosoccus* 3 и жирных кислот с короткой цепью [54]. Поскольку церамиды обнаружены в циркулирующих частицах ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, их уровни в сыворотке можно снизить с помощью мер по снижению уровня ХС [55].

5. Курение

Курение является общепризнанным модифицируемым фактором риска ССЗ [56]. Ранее проведенные исследования показали, что курящие пациенты с ИБС подвергаются коронарной реваскуляризации в более молодом возрасте и имеют высокую смертность по сравнению

с некурящими. Отказ от курения значительно снижает АД и частоту сердечных сокращений уже через 24 ч, а в течение года риск повторных ССЗ и смертности от всех причин снижается вдвое [57].

Несмотря на хорошо известную взаимосвязь между курением и ССЗ, а также ССЗ и липидами, прямое влияние курения на церамиды изучено недостаточно, в основном в экспериментальных исследованиях. Так, S. Boué и соавт. подвергали мышей *ApoE^{-/-}* (хорошо зарекомендовавшей себя мышинной модели атерогенеза человека) воздействию потока сигаретного дыма в течение 6 мес. и сравнивали липидные профили плазмы и тканей с группой контроля, подвергавшейся воздействию воздуха. Выявлены повышенные уровни ХС, церамидов, цереброзидов, фосфолипидов и различных сфингоидных оснований – метаболитов пути синтеза церамидов *de novo* в плазме мышей, подвергшихся воздействию сигаретного дыма. В стенке аорты мышей наблюдалось накопление церамидов, но накопление эфиров ХС пропорционально превышало накопление церамидов. Поскольку было показано значительное увеличение относительной доли дигидро-церамидов и дигидро-сфингомиелинов среди церамидов в аорте мышей, подвергшихся воздействию сигаретного дыма, предполагают, что курение индуцирует синтез церамидов *de novo* в стенке сосудов [58].

Аналогичные результаты о повышении плазменных уровней церамидов продемонстрировали и другие исследователи. С. I. Cruickshank-Quinn и соавт. использовали мышиную модель хронического воздействия сигаретного дыма, определяли, вызывает ли сигаретный дым изменения метаболических профилей липидов, а также их постоянство после прекращения курения. Показано, что церамиды (d18:1/20:0) и галабиозилцерамиды (d18:1/25:0) увеличивались при курении. Хотя их уровни снижались после прекращения влияния сигаретного дыма, они оставались повышенными по сравнению с группой контроля (воздействие воздуха) [59]. Воздействие сигаретного дыма в течение 3 мес. приводило к значительному повышению отношения С(d18:1/24:0) и С(d18:1/24:1) к С(d18:1/18:0) в плазме, печени, легких и брюшной аорте мышей [60].

Заключение

Таким образом, церамиды могут рассматриваться в качестве новых факторов сердечно-сосудистого риска, отражающих предрасположенность к ССЗ. Их определение играет важную роль для стратификации риска как в дополнение к традиционным факторам риска, так и самостоятельно. Более того, последовательные измерения уровней церамидов могут иметь более высокую прогностическую ценность при первичной и вторичной профилактике ССЗ, чем другие биомаркеры. Однако необходимо проведение дальнейших рандомизированных исследований, чтобы оценить влияние этого маркера на прогноз и лечение в зависимости от уровня церамидов в плазме.

Литература / References

1. Шрамко В.С., Морозов С.В., Черняк Е.И., Щербакова Л.В., Кургузов А.В., Чернявский А.М. и др. Клинические характеристики пациентов с атеросклерозом коронарных артерий в зависимости от жирно-кислотного спектра крови. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2020;9(1):15–24.

[Shramko V.S., Morozov S.V., Chernyak E.I., Shcherbakova L.V., Kurguzov A.V., Chernyavskiy A.M. et al. Clinical characteristics of patients with coronary atherosclerosis depending on blood fatty acids. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2020;9(1):15–24. (In Russ.). DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-1-15-24.

2. Carrard J., Gallart-Ayala H., Weber N., Colledge F., Streese L., Hansen H. et al. How ceramides orchestrate cardiometabolic health—an ode

- to physically active living. *Metabolites*. 2021;11(10):675. DOI: 10.3390/metabo11100675.
3. Kuijpers P. History in medicine: The story of cholesterol, lipids and cardiology. *J. Cradiol. Pract.* 2021;19:1–5.
 4. Laaksonen R., Ekroos K., Sysi-Aho M., Hilvo M., Vihervaara T., Kauhanen D. et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur. Heart J.* 2016;37:1967–1976. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw148.
 5. Hilvo M., Meikle P.J., Pedersen E.R., Tell G.S., Dhar I., Brenner H. et al. Development and validation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *Eur. Heart J.* 2019;41:371–380. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz387.
 6. Meeusen J.W., Donato L.J., Bryant S.C., Baudhuin L.M., Berger P.B., Jaffe A.S. et al. Plasma Ceramides: A novel predictor of major adverse cardiovascular events after coronary angiography. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38(8):1933–1939. DOI: 10.1161/atvbaha.118.311199.
 7. Shalaby Y.M., Al Aidaros A., Valappil A., Ali B.R., Akawi N. Role of Ceramides in the molecular pathogenesis and potential therapeutic strategies of cardiometabolic diseases: What we know so far. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022;9:816301. DOI: 10.3389/fcell.2021.816301.
 8. Yang F., Liu C., Liu X., Pan X., Li X., Tian L. et al. Effect of epidemic intermittent fasting on cardiometabolic risk factors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front. Nutr.* 2021;8:669325. DOI: 10.3389/fnut.2021.669325.
 9. Havulinna A.S., Sysi-Aho M., Hilvo M., Kauhanen D., Hurme R., Ekroos K. et al. Circulating ceramides predict cardiovascular outcomes in the population-based FINRISK 2002 Cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016;36(12):2424–2430. DOI: 10.1161/ATVBaha.116.307497.
 10. Vasile V.C., Meeusen J.W., Inojosa M.J.R., Donato L.J., Scott C.G., Hyun M.S. et al. Ceramide scores predict cardiovascular risk in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021;41(4):1558–1569. DOI: 10.1161/ATVBaha.120.315530.
 11. Chatham J.C., Young M.E. Metabolic remodeling in the hypertrophic heart: fuel for thought. *Circ. Res.* 2012;111:666–668. DOI: 10.1161/circresaha.112.277392.
 12. Merrill A.H.Jr. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemistry Review.* 2011;111:6387–6422. DOI: 10.1021/cr2002917.
 13. Tippetts T.S., Holland W.L., Summers S.A. Cholesterol – the devil you know; ceramide – the devil you don't. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2021;42(12):1082–1095. DOI: 10.1016/j.tips.2021.10.001.
 14. McGurk K.A., Keavney B.D., Nicolaou A. Circulating ceramides as biomarkers of cardiovascular disease: Evidence from phenotypic and genomic studies. *Atherosclerosis.* 2021;327:18–30. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.021.
 15. Crewe C., Joffi N., Rutkowski J.M., Kim M., Zhang F., Towler D.A. et al. An endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state. *An. Cell.* 2018;175(3):695–708.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.005.
 16. Li W., Yang X., Xing S., Bian F., Yao W., Bai X. et al. Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxld across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014;823071. DOI: 10.1155/2014/823071.
 17. Ruuth M., Nguyen S.D., Vihervaara T., Hilvo M., Laajala T.D., Kondadi P.K. et al. Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *Eur. Heart J.* 2018;39(27):2562–2573. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy319.
 18. Ichi I., Nakahara K., Miyashita Y., Hidaka A., Kutsukake S., Inoue K. et al. Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis. *Lipids.* 2006;41(9):859–863. DOI: 10.1007/s11745-006-5041-6.
 19. Ng T.W., Ooi E.M., Watts G.F., Chan D.C., Meikle P.J., Barrett P.H. Association of plasma ceramides and sphingomyelin with VLDL apoB-100 fractional catabolic rate before and after rosuvastatin treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;100(6):2497–2501. DOI: 10.1210/jc.2014-4348.
 20. Zhou B., Xiao J.F., Tuli L., Resson H.W. LC-MS-based metabolomics. *Mol. Biosyst.* 2012;8(2):470–481. DOI: 10.1039/c1mb05350g.
 21. Kita Y., Tokuoka S.M., Shimizu T. Mediator lipidomics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2017;1862(8):777–781. DOI: 10.1016/j.bbalip.2017.03.008.
 22. Lange M., Angelidou G., Ni Z., Crisculo A., Schiller J., Blüher M. et al. AdipoAtlas: A reference lipidome for human white adipose tissue. *Cell Rep. Med.* 2021;2(10):100407. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100407.
 23. Hojjati M.R., Li Z., Zhou H., Tang S., Huan C., Ooi E. et al. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 2005;280:10284–10289. DOI: 10.1074/jbc.M412348200.
 24. Meikle P.J., Wong G., Tsorotes D., Barlow C.K., Weir J.M., Christopher M.J. et al. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(11):2723–2732. DOI: 10.1161/ATVBaha.111.234096.
 25. Alonso A., Goñi F.M. The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 2018;47:633–654. DOI: 10.1146/annurev-biophys-070317-033309.
 26. Fretts A.M., Jensen P.N., Hoofnagle A.N., McKnight B., Sitlani C.M., Sis-covick D.S. et al. Circulating ceramides and sphingomyelins and risk of mortality: The cardiovascular health study. *Clin. Chem.* 2021;67:1650–1659. DOI: 10.1093/clinchem/hvab182.
 27. Anroedh S., Hilvo M., Akkerhuis K.M., Kauhanen D., Koistinen K., Oem-rawsingh R. et al. Plasma concentrations of molecular lipid species predict long-term clinical outcome in coronary artery disease patients. *J. Lipid Res.* 2018;59:1729–1737. DOI: 10.1194/jlr.P081281.
 28. Mundra P.A., Barlow C.K., Nestel P.J., Barnes E.H., Kirby A., Thompson P. et al. Large-scale plasma lipidomic profiling identifies lipids that predict cardiovascular events in secondary prevention. *JCI Insight.* 2018;3:121326. DOI: 10.1172/jci.insight.121326.
 29. Hilvo M., Wallentin L., Ghukasyan Latic T., Held C., Kauhanen D., Jylhä A. et al. Prediction of residual risk by ceramide-phospholipid score in patients with stable coronary heart disease on optimal medical therapy. *J. Am. Heart Assoc.* 2020;9:e015258. DOI: 10.1161/JAHA.119.015258.
 30. 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):2439–2454. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab309.
 31. Poss A.M., Maschek J.A., Cox J.E., Hauner B.J., Hopkins P.N., Hunt S.C. et al. Machine learning reveals serum sphingolipids as cholesterol-independent biomarkers of coronary artery disease. *J. Clin. Invest.* 2020;130(3):1363–1376. DOI: 10.1172/JCI131838.
 32. Wagner-Golbs A., Neuber S., Kamlage B., Christiansen N., Bethan B., Rennfahrt U. et al. Effects of long-term storage at -80°C on the human plasma metabolome. *Metabolites.* 2019;9(5):99. DOI: 10.3390/metabo9050099.
 33. Walls S.M., Cammarato A., Chatfield D.A., Ocoro K., Harris G.L., Bodmer R. Ceramide-protein interactions modulate ceramide-associated lipotoxic cardiomyopathy. *Cell Rep.* 2018;22:2702–2715. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.034.
 34. Kurz J., Parnham M.J., Geisslinger G., Schiffmann S. Ceramides as novel disease biomarkers. *Trends Molecular Medicine.* 2019;25(1):20–32. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.10.009.
 35. Vozella V., Basit A., Piras F., Realini N., Armirotti A., Bossù P. et al. Elevated plasma ceramide levels in post-menopausal women: A cross-sectional study. *Aging.* 2019;11(1):73–88. DOI: 10.18632/aging.101719.
 36. Mielke M.M., Bandaru V.V.R., Han D., An Y., Resnick S.M., Ferrucci L. et al. Demographic and clinical variables affecting mid- to late-life trajectories of plasma ceramide and dihydroceramide species. *Aging Cell.* 2015;14:1014–1023. DOI: 10.1111/accel.12369.
 37. Wooten-Blanks L.G., Song P., Senkal C.E., Ogretmen B. Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1. *Faseb. J.* 2007;21:3386–3397. DOI: 10.1096/fj.07-8621.com.
 38. Smith A.R., Visioli F., Frei B., Hagen T.M. Age-related changes in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and nitric oxide dependent vasodilation: evidence for a novel mechanism involving sphingomyelinase and ceramide-activated phosphatase 2A. *Aging Cell.* 2006;5(5):391–400. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2006.00232.x.
 39. Mielke M.M., Bandaru V.V.R., Han D., An Y., Resnick S.M., Ferrucci L. et al. Factors affecting longitudinal trajectories of plasma sphingomyelins: Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Cell.* 2015;14:112–121. DOI: 10.1111/accel.12275.
 40. Bui H.H., Leohr J.K., Kuo M.S. Analysis of sphingolipids in extracted human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2012;423(2):187–194. DOI: 10.1016/j.ab.2012.01.027.
 41. Hammad S.M., Pierce J.S., Soodavar F., Smith K.J., Al Gadban M.M., Rembiesa B. et al. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J. Lipid Res.* 2010;51(10):3074–3087. DOI: 10.1194/jlr.D008532.
 42. Jeyarajah E.J., Cromwell W.C., Otvos J.D. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin. Lab. Med.* 2006;26:847–870. DOI: 10.1016/j.cl.2006.07.006.
 43. Di Palo K.E., Barone N.J. Hypertension and heart failure: prevention, targets, and treatment. *Heart Fail. Clin.* 2020;16:99–106. DOI: 10.1016/j.hfc.2019.09.001.

44. Spijkers L.J., van den Akker R.F., Janssen B.J., Debets J.J., De Mey J.G., Stroes E.S. et al. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. *PLoS One*. 2011;6(7):e21817. DOI: 10.1371/journal.pone.0021817.
45. Lin Y.-T., Salihovic S., Fall T., Hammar U., Ingelsson E., Årnlöv J. et al. Global plasma metabolomics to identify potential biomarkers of blood pressure progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020;40:e227–e237. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314356.
46. Kulkarni H., Meikle P.J., Mamtani M., Weir J.M., Barlow C.K., Jowett J.B. et al. Plasma lipidomic profile signature of hypertension in Mexican American families: specific role of diacylglycerols. *Hypertension*. 2013;62(3):621–626. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONA.113.01396.
47. Spijkers L.J., Janssen B.J., Nelissen J., Meens M.J., Wijesinghe D., Chalfant C.E. Antihypertensive treatment differentially affects vascular sphingolipid biology in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 2011;6(12):e29222. DOI: 10.1371/journal.pone.0029222.
48. Liu A., Chu Y.-J., Wang X., Yu R., Jiang H., Li Y. et al. Serum metabolomics study based on LC-MS and antihypertensive effect of uncaria on spontaneously hypertensive rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2018;2018:9281946. DOI: 10.1155/2018/9281946.
49. van den Eisen L.W., Spijkers L.J., van den Akker R.F., van Winsen A.M., Balvers M., Wijesinghe D.S. Dietary fish oil improves endothelial function and lowers blood pressure via suppression of sphingolipid-mediated contractions in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2014;32(5):1050–1058; discussion 1058. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000131.
50. Chaurasia B., Summers S.A. Ceramides-Lipotoxic inducers of metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 2015;26:538–550. DOI: 10.1016/j.tem.2015.07.006.
51. Poss A.M., Summers S.A. Too much of a good thing? An evolutionary theory to explain the role of ceramides in nafid. *Front. Endocrinol.* 2020;11:505. DOI: 10.3389/fendo.2020.00505.
52. Summers S.A., Chaurasia B., Holland W.L. Metabolic messengers: Ceramides. *Nat. Metab.* 2019;1(11):1051–1058. DOI: 10.1038/s42255-019-0134-8.
53. Raichur S., Wang S.T., Chan P.W., Li Y., Ching J., Chaurasia B. et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits β -Oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* 2014;20(4):687–695. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.09.015.
54. Vijay A., Astbury S., Panayiotis L., Marques F.Z., Spector T.D., Menni C. et al. Dietary interventions reduce traditional and novel cardiovascular risk markers by altering the gut microbiome and their metabolites. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:691564. DOI: 10.3389/fcvm.2021.691564.
55. Hilvo M., Simolin H., Metso J., Ruuth M., Öörni K., Jauhiainen M. et al. PCSK9 inhibition alters the lipidome of plasma and lipoprotein fractions. *Atherosclerosis*. 2018;269:159–165. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.004.
56. Aittokallio J., Palmu J., Niiranen T. Smoking is the strongest modifiable risk factor for mortality post coronary revascularisation. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2020;27:2308–2310. DOI: 10.1177/2047487319894883.
57. Parasuraman S., Zaman A.G., Egred M., Bagnall A., Broadhurst P.A., Ahmed J. et al. Smoking status and mortality outcomes following percutaneous coronary intervention. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2020;28:1222–1228. DOI: 10.1177/2047487320902325.
58. Boué S., Tarasov K., Jänis M., Lebrun S., Hurme R., Schlage W. et al. Modulation of atherogenic lipidome by cigarette smoke in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):328–334. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.032.
59. Cruickshank-Quinn C.I., Mahaffey S., Justice M.J., Hughes G., Armstrong M., Bowler R.P. et al. Transient and persistent metabolomic changes in plasma following chronic cigarette smoke exposure in a mouse model. *PLoS One*. 2014;9(7):e101855. DOI: 10.1371/journal.pone.0101855.
60. Lavrynenko O., Titz B., Dijon S., Santos D.D., Nury C., Schneider T. et al. Ceramide ratios are affected by cigarette smoke but not heat-not-burn or e-vapor aerosols across four independent mouse studies. *Life Sci.* 2020;263:118753. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118753.

Информация о вкладе авторов

Белик Е.В. – концепция статьи, поиск и анализ научной литературы, написание статьи.

Дылева Ю.А. – концепция статьи, поиск и анализ научной литературы, написание статьи.

Груздева О.В. – концепция статьи, написание статьи, окончательная правка, утверждение конечного варианта статьи.

Сведения об авторах

Белик Екатерина Владимировна, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория исследований гомеостаза, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0003-3996-3325.

E-mail: sionina.ev@mail.ru.

Дылева Юлия Александровна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория исследований гомеостаза, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-6890-3287.

E-mail: dyleva87@yandex.ru.

Груздева Ольга Викторовна, д-р мед. наук, профессор РАН, заведующий лабораторией исследований гомеостаза, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-7780-829X.

E-mail: o_gruzdeva@mail.ru.

 **Белик Екатерина Владимировна**, e-mail: sionina.ev@mail.ru.

Information on author contributions

Belik E.V. developed the concept of the work, searched and analyzed scientific literature, wrote the manuscript.

Dyleva Yu.A. developed the concept of the work, searched and analyzed scientific literature, wrote the manuscript.

Gruzdeva O.V. developed concept of the work, wrote the manuscript, performed final editing, approved the final version of the manuscript.

Information about the authors

Ekaterina V. Belik, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory for Homeostasis Research, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0003-3996-3325.

E-mail: sionina.ev@mail.ru.

Yulia A. Dyleva, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Laboratory for Homeostasis Research, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-6890-3287.

E-mail: dyleva87@yandex.ru.

Olga V. Gruzdeva, Dr. Sci. (Med.), Professor of Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory for Homeostasis Research, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-7780-829X.

E-mail: o_gruzdeva@mail.ru.

 **Ekaterina V. Belik**, e-mail: sionina.ev@mail.ru.

Received August 8, 2022

Поступила 08.08.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-37-45>
УДК 616-008.9-02:616.127-005.4-085.224-036.8

Дистантное посткондиционирование миокарда: механизмы, эффективность при метаболическом синдроме в экспериментальных и клинических исследованиях (обзор)

А.В. Мухомедзянов¹, М.А. Сиротина¹, С.В. Логвинов^{1,2}, Н.В. Нарыжная¹

¹ Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

² Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, ул. Московский тракт, 2

Аннотация

Дистантное посткондиционирование сердца (ДПост) – проведение нескольких периодов краткосрочной ишемии-реперфузии удаленного от сердца органа после длительного периода ишемии непосредственно перед возобновлением коронарного кровотока или же в раннем реперфузионном периоде, что приводит к сокращению размера формирующегося впоследствии инфаркта – представляет большой терапевтический потенциал для клинической практики.

Механизм ДПост включает триггер, на роль которого могут претендовать аденозин, опиоиды, каннабиноиды, брадикинин, CGRP и субстанция Р. Важную роль в сигнальном механизме ДПост играют протеинкиназа С, Р13-киназа, киназа Akt и JAK. В экспериментальных исследованиях обнаружено, что генетически детерминированные или вызванные диетой метаболические изменения снижают эффективность кардиопротекции при ДПост. В качестве возможных механизмов неэффективности кардиопротекции можно предположить снижение выброса гуморальных факторов, дисфункцию рецепторного и сигнального звена ДПост, влияние метаболических нарушений на работу КАТФ-каналов, mPTP и на состояние митохондриального дыхания. Однако эти предположения нуждаются в экспериментальном обосновании. Результаты клинических исследований показывают как наличие антинекротического и инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост при остром инфаркте миокарда (ОИМ) и кардиохирургических вмешательствах, так и отсутствие его эффективности. Роль метаболических нарушений в отсутствии эффективности ДПост у пациентов требует обоснования.

Ключевые слова:	миокард, ишемия, реперфузия, дистантное посткондиционирование, метаболический синдром.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-25-20001) и средств Администрации Томской области.
Для цитирования:	Мухомедзянов А.В., Сиротина М.А., Логвинов С.В., Нарыжная Н.В. Дистантное посткондиционирование миокарда: механизмы, эффективность при метаболическом синдроме в экспериментальных и клинических исследованиях (обзор). <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):37–45. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-37-45 .

Remote postconditioning of myocardium: mechanisms, efficacy in metabolic syndrome in experimental and clinical studies (review)

Alexander V. Mukhomedzyanov¹, Maria A. Sirofina¹, Sergey V. Logvinov^{1, 2}, Natalya V. Naryzhnaya¹

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111a, Kievskaya str, Tomsk, 634012, Russian Federation

² Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Moskovsky trakt str., Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Remote postconditioning of the heart (RPost) – performed several periods of short-term ischemia-reperfusion of an remote organ after a long period of ischemia immediately before the resumption or in the early reperfusion, which leads to a reduction in the size of the subsequently formed infarction – represents a great therapeutic potential for clinical practice. The mechanism of remote postconditioning includes a trigger that can be played by adenosine, opioids, cannabinoids, bradykinin, CGRP, and substance P. Protein kinase C, PI3 kinase, Akt kinase, and JAK play an important role in the signaling mechanism of remote postconditioning. Experimental studies found that genetically determined or diet-induced metabolic changes reduce the effectiveness of cardioprotection in RPost. As possible mechanisms of cardioprotection inefficiency, we can suggest a decrease in the release of humoral factors, dysfunction of the receptor and signaling link of RPost, the effect of metabolic disorders on the functioning of KATP channel, mPTP, and on the state of mitochondrial respiration. However, these assumptions need experimental substantiation. The results of clinical studies show both the antinecrotizing and infarct-limiting effect of RPost in AMI and cardiac surgery, and the lack of its effectiveness. The role of metabolic disorders in the absence of the effectiveness of RPost in patients requires substantiation.

Keywords:	myocardium, ischemia, reperfusion, remote postconditioning, metabolic syndrome.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the work was funded by the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-20001) and the Tomsk Region Administration.
For citation:	Mukhomedzyanov A.V., Sirofina M.A., Logvinov S.V., Naryzhnaya N.V. Remote postconditioning of myocardium: mechanisms, efficacy in metabolic syndrome in experimental and clinical studies (review). <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):37–45. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-37-45 .

Введение

Реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии с применением тромболиза и коронарной ангиопластики в терапии острого инфаркта миокарда (ОИМ) в последние десятилетия показала высокую эффективность при лечении острого коронарного синдрома. Однако достигнутый показатель смертности на уровне 5% не претерпевает изменений, несмотря на всё более широкое использование инвазивных и неинвазивных методов реканализации коронарных артерий в клинической практике [1]. Причиной смерти пациентов в большинстве случаев является острая сердечная недостаточность, развитие которой происходит в результате чрезмерно интенсивного ишемического и реперфузионного (И/Р) повреждения миокарда [2]. Очевидно, что проблема разработки принципиально новых методов и препаратов для ограничения И/Р повреждения сердца является важной задачей современной фармакологии. Эта задача может быть решена через внедрение новых методов, повышающих устойчивость миокарда к ишемии и реперфузии, а также

через поиск молекулярных мишеней для повышения толерантности сердца к реперфузионному повреждению.

Одним из подходов к поиску новых путей предупреждения и лечения И/Р повреждения миокарда является исследование механизмов кардиопротекции, формирующейся при неспецифических адаптационных воздействиях – различных кондиционирующих процедурах. Наибольший терапевтический потенциал для клинической практики представляет феномен дистантного посткондиционирования (ДПост) [3].

ДПост – проведение нескольких периодов краткосрочной ишемии–реперфузии удаленного от сердца органа (конечности, почки) после длительного периода ишемии непосредственно перед возобновлением коронарного кровотока или же в раннем реперфузионном периоде, что приводит к сокращению размера формирующегося впоследствии инфаркта. Этот феномен был открыт в 2005 г. группой исследователей под руководством профессора J. Vinten-Johansen [4]. Снижение размера инфаркта при экспериментальной коронароокклюзии–реперфузии под влиянием ДПост достигает 50% [4]. Важнейшее преимуще-

щество ДПост перед локальным пре- и посткондиционированием состоит в его малой инвазивности, отсутствии риска аритмий и технической простоте при эффективности, сопоставимой с локальным кондиционированием [3].

Однако следует отметить, что высокая эффективность ДПост была подтверждена преимущественно в экспериментальных исследованиях. До настоящего времени в клинике не удалось подтвердить многие экспериментальные достижения в этой области, на основе полученных знаний не создано новых кардиопротекторных препаратов. Одной из причин этого является тот факт, что большинство исследований кардиопротективных воздействий выполняли на здоровых животных, тогда как в клинике врач имеет дело с уже патологически измененным миокардом у пациента и с многочисленной сопутствующей патологией. Следовательно, трансляция экспериментальных результатов в клиническую практику требует проведения исследования эффективности этих воздействий в условиях, приближенных к реальным. В частности, ишемическая болезнь сердца в большом числе случаев сопровождается ожирением и сахарным диабетом. Наличие у пациента метаболических нарушений, таких как гиперлипидемия, гипергликемия, которые в совокупности с артериальной гипертонией, инсулинорезистентностью и рядом других факторов составляют симптомокомплекс, называемый в современной медицине метаболическим синдромом (МС), который является важной проблемой, ограничивающей применение кондиционирующих воздействий. Чтобы предложить ДПост как эффективную кардиозащитную стратегию, важно определить, оказывает ли ДПост инфаркт-лимитирующий эффект при наличии МС. Выявление механизмов нарушения эффективности кардиопротекторного действия ДПост при МС позволит найти новые терапевтические мишени для фармакологической коррекции реперфузионного повреждения миокарда, скорректировать стратегию трансляции ДПост в клиническую практику.

Кардиопротекторный эффект дистантного посткондиционирования и его механизмы

Первые доказательства эффективности ДПост в эксперименте были получены группой исследователей под руководством профессора J. Vinten-Johansen [3]. В экспериментах на крысах после 30-минутной коронароокклюзии были проведены три сеанса 5-минутной перевязки почечной артерии, чему следовала 2-часовая реперфузия. Оказалось, что ДПост способствует уменьшению размера инфаркта в 2 раза, а также достоверному уменьшению концентрации креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови. В этом же исследовании была показана неэффективность однократного пережатия почечной артерии либо ее необратимой перевязки. Исследователи выдвинули предположение о том, что при наступлении реперфузионного периода из ишемизированного органа могут высвободиться в кровеносную систему эндогенные вещества, вызывающие уменьшение размера инфаркта.

В 2006 г. эффективность применения ДПост была подтверждена у кроликов. Было доказано, что кардиопротекторный эффект ДПост сопоставим с таковым при ишемическом прекодиционировании, ишемическом посткондиционировании миокарда [5]. Помимо кардиопротекторного эффекта в этом исследовании было выявлено уменьшение концентрации в плазме крови маркера

повреждения миокарда КФК и малонового диальдегида (МДА), что может отражать уменьшение активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ишемизированном миокарде. В 2007 г. был подтвержден инфаркт-лимитирующий эффект ДПост на модели 90-минутной коронароокклюзии и 72-часовой реперфузии у свиней [6]. Одной из моделей ДПост с подтвержденной эффективностью является воздействие раздражения кожи электрическим током или кожных аппликаций капсаицином у мышей в период ранней реперфузии, что приводит к уменьшению инфаркта, снижению выраженности апоптоза, морфологических признаков воспалительного ответа [7].

Экспериментальные данные указывают на то, что моделирование ДПост может осуществляться не только за счет ишемии-реперфузии удаленного от сердца органа. Так, J. Fang и соавт. воспроизвели ДПост с помощью трех циклов (10 с) ишемии и реперфузии огибающей ветви коронарной артерии [8]. Оказалось, что при использовании этой модели происходит достоверное уменьшение соотношения зоны инфаркта/зоны риска (ЗИ/ЗР), а также снижение уровня КФК-МВ и МДА в плазме крови. Таким образом, кратковременная ишемия-реперфузия одного участка сердца способна увеличить устойчивость другого участка к действию длительной коронароокклюзии и реперфузии.

Было показано, что ДПост обладает антиапоптотическим действием [9]. В 2011 г. M. Wei и соавт. показали, что ДПост способно предотвращать постинфарктное ремоделирование миокарда и уменьшать негативные эффекты после ИМ спустя длительное время [10].

Известно, что в патогенезе реперфузионных повреждений сердца важную роль играет воспаление. В экспериментах на крысах было показано, что ДПост уменьшает количество нейтрофилов в зоне миокарда, подвергшегося действию ишемии, и концентрацию миелопероксидазы, маркера нейтрофильной инфильтрации [8, 10]. Было установлено, что ДПост уменьшает уровень продукции провоспалительных цитокинов IL-10, TNF- α , хемокина MCP-1 в зоне реперфузии миокарда [10]. В исследовании G. Chen и соавт. (2016) обнаружено, что ДПост способствует снижению активности в нейтрофилах НАДФН-оксидазы – фермента, который является одним из источников активных форм кислорода при И/Р повреждении; снижению MyD88, TRAF6, p38 mitogen-activated protein kinase (p38-МАРК) в нейтрофилах [11]. Таким образом, при ДПост снижается не только количество инфильтрирующих миокард нейтрофилов, но и степень их активации.

В настоящий момент в качестве основных механизмов кардиопротекторного действия ДПост обсуждается влияние этого воздействия на состояние вегетативной нервной системы (ВНС) и воздействие на миокард гуморальных факторов, выделяющихся в кровоток из подвергнутой ишемии мышечной ткани. Основанием для гипотезы о роли ВНС в механизме ДПост стали исследования, показавшие участие вегетативных влияний в реализации кардиопротекторного эффекта дистантного прекодиционирования (ДПре) [12]. Однако следует отметить, что ДПре в этом исследовании моделировали путем хирургической травмы при рассечении брюшной стенки за 15 мин до перевязки коронарной артерии, при этом наблюдали снижение размера инфаркта в 6 раз по отношению к контролю. Введение гексаметония (блокатор вегетативных ганглиев) полностью устраняло данный эффект хирургической травмы. Таким образом, доказательства участия

нервной системы в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост немногочисленны, и этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Гуморальная гипотеза ДПост основана на предположении о том, что кардиопротекторный эффект ДПост осуществляется при воздействии на миокард вещества (или веществ), выделяющегося в кровь во время процедуры посткондиционирования [13]. Одним из наглядных экспериментов в этом направлении стали опыты, в которых раствором (эфлюентом), оттекающим от изолированного сердца крысы при проведении трех 5-минутных циклов глобальной ишемии-реперфузии (режим кондиционирования), перфузировали другое сердце при длительной реперфузии. Обнаружено, что этот эфлюент обладал выраженными кардиопротекторными свойствами [13]. При попытке идентифицировать гуморальный фактор, обеспечивающий протекцию, оказалось, что это гидрофобное соединение с молекулярной массой около 30 кДа [13]. Поиски данного фактора или факторов продолжают до настоящего времени. Среди наиболее вероятных кандидатов на это место рассматриваются агонисты G-белок связанных рецепторов (GPCR), такие как аденозин, брадикинин, опиоидные пептиды, эндоканнабиноиды [14], а также оксид азота, цитокины и микровезикулы с некодирующей РНК.

ncRNA. Предполагают, что гуморальным фактором ДПост могут быть микровезикулы с некодирующими РНК (*ncRNA*). Так, в исследовании Z. Wang и соавт. (2019) была выявлена экспрессия некодирующих РНК (*ncRNA*) в миокарде крыс при ДПост [15]. Показано, что *ncRNA* могут выделяться из ишемизированных при ДПост клеток дистального органа, транспортироваться к миокарду и запускать кардиозащитные механизмы [16].

Оксид азота. В экспериментах на кроликах Y. Tang и соавт. [17] показали, что инфаркт-лимитирующий эффект ДПост не проявляется в условиях блокады NO-синтазы метиловым эфиром L-NG-нитро-L-аргинина. Однако, учитывая тот факт, что период полураспада NO в биологических тканях составляет 5,6 с, маловероятно, что это соединение является гуморальным фактором, обеспечивающим кардиопротекцию. По-видимому, NO является тем веществом, которое лишь опосредует инфаркт-лимитирующий эффект гуморального фактора на уровне сердца. Действительно, ДПост повышает экспрессию эндотелиальной NO-синтазы кардиомиоцитами [17]. Этот факт свидетельствует о том, что NO играет скорее роль внутриклеточного медиатора ДПост, чем триггера.

Рецепторное звено механизма дистантного посткондиционирования. Как уже упоминалось ранее, предполагаемыми гуморальными факторами ДПост могут быть агонисты GPCR, эффекты которых осуществляются за счет взаимодействия со специфическим рецептором. Одними из первых рецепторов, участие которых в реализации ДПост было подтверждено, стали аденозиновые рецепторы [4].

Результаты наших исследований свидетельствуют о важной роли опиоидных рецепторов в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост [18]. Кроме того, показано, что посткондиционирование может быть воспроизведено путем активации периферических дельта-опиоидных рецепторов [19] или центральных мю-опиоидных рецепторов [20], а имитация ДПост фентанилом опосредована через активацию каппа-опиоидных рецепторов [21]. При этом обнаружено, что сами каппа-опиоид-

ные рецепторы не участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ДПост.

В реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост показано участие ваниллоидных рецепторов (TRPV1-каналов) [22]. Вместе с тем вопрос о локализации этих рецепторов остается открытым. Так, активация TRPV1 периферических нервных окончаний приводит к высвобождению некоторых нейропептидов, в частности пептида, родственного гену кальцитонина (CGRP) и субстанции P (SP), которые в свою очередь могут опосредовать посткондиционирование [22]. Доказательств участия миокардиальных TRPV1-каналов в посткондиционировании не получено.

Обнаружено участие в ДПост брадикининовых рецепторов. Сообщается, что у мышей, нокаутных по гену брадикининового рецептора второго типа (линия BK2RKO), не формируется инфаркт-лимитирующий эффект ДПост [7].

Возможным кандидатом на роль гуморального фактора ДПост являются эндоканнабиноиды. Так, обнаружено, что каннабиноиды могут имитировать ДПост [23], однако до настоящего времени эксперименты с селективными антагонистами CB-рецепторов на модели ДПост не проведены.

Внутриклеточный сигнальный механизм дистантного посткондиционирования

Протеинкиназа C. В ткани миокарда мышей в ответ на ДПост обнаружено увеличение активированной формы PKC α [7]. При этом инфаркт-лимитирующий эффект ДПост в присутствии ингибитора этой киназы не проявлялся как у крыс [24], так и у мышей [7]. Наши исследования показали, что протеинкиназа C участвует в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост у крыс [25].

Киназа PI3/Akt киназа. Было показано, что ДПост приводит к увеличению количества киназы Akt в кардиомиоцитах [17], а также количества фосфорилированной (активированной формы) киназы Akt в миокарде [26, 27]. Как мы отметили выше, L. Breivik и соавт. обнаружили, что после ишемического прекоондиционирования в коронарном оттоке появляется биологически активный пептид, способный имитировать феномен ДПост в экспериментах на другом изолированном перфузируемом сердце [13]. Оказалось, что ингибитор киназы PI3 вортманнин или ингибитор Akt-киназы SH-6 полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект коронарного эфлюента а этом эксперименте. Полученные данные подтверждают гипотезу об участии PI3/Akt киназ в кардиопротекторном действии ДПост.

JAK. Киназы JAK относятся к цитозольным тирозинкиназам, которые специфически связаны с рецепторами цитокинов и факторами роста: фактором некроза опухоли α (TNF- α), лептином, эритропоэтином, интерлейкином 6 (IL-6), интерфероном- γ , фактором роста фибробластов-2 [28]. После взаимодействия с активированным цитокиновым рецептором происходит автофосфорилирование JAK, после чего она фосфорилирует STAT [29]. Установлено, что ингибирование JAK приводило к исчезновению инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост [26].

Таким образом, приведенные исследования позволяют говорить о том, что инфаркт-лимитирующий эффект ДПост связан с выбросом гуморальных факторов: аденозина, опиоидных пептидов, брадикинина, эндоканнабиноидов и последующей активацией связанного

с их рецепторами внутриклеточного киназного каскада PI3-киназы, Akt-киназы, протеинкиназы С и JAK-киназы. Следует отметить, что молекулярный механизм ДПост изучен недостаточно; вклад в механизм ДПост других киназ и каналов, которые участвуют в реализации ишемического пре- и посткондиционирования, остается неисследованным.

Механизмы снижения эффективности дистантного посткондиционирования при метаболическом синдроме в экспериментальных исследованиях

Данные об эффективности разного рода кондиционирующих воздействий при диабете и МС противоречивы. Выявлено как снижение эффективности кондиционирующих стимулов при диабете, гиперлипидемии или дислипидемии [30], так и отсутствие подобных влияний [31]. Наши исследования показали, что моделирование МС у крыс приводит к снижению инфаркт-лимитирующей эффективности ДПост в исследовании *in vivo* [32].

В качестве механизмов, обуславливающих несостоятельность защитных эффектов кондиционирующих воздействий, рассматриваются нарушение функционирования внутриклеточных киназных механизмов защиты [33] и инсулинорезистентность миокарда, обусловленная в том числе эндокринным влиянием жировой ткани [34].

Немногочисленные данные свидетельствуют об изменениях рецепторного аппарата клеток при ожирении/содержании животных на высокожировой диете. Так, известно о снижении представительства рецепторов к лептину на мембранах кардиомиоцитов у крыс, содержащихся на высокожировой диете [35]. Известно, что повышение уровня лептина и лептинорезистентность сопряжены с развитием ожирения и обуславливают его связь с развитием сердечно-сосудистой патологии [36]. Наше исследование показало более чем двукратное возрастание лептина у крыс с МС [34]. Сходные результаты были получены J.S. Russell и соавт. (2019) у крыс при ожирении, развивающемся вследствие высококалорийной диеты [37]. Выявлена прямая зависимость размера инфаркта при ДПост от содержания лептина в сыворотке крови крыс с МС [32]. В качестве механизма связи лептина с выраженностью кардиопротекции при ДПост можно предположить его влияние на активность внутриклеточных киназ, реализующих эффекты ДПост. Так, выявлено, что лептин приводит к активации (фосфорилированию) p38 MAPK [38], одного из ферментов, через ингибирование которого реализуется эффект фармакологического и ишемического посткондиционирования.

Противоположным объяснением низкой эффективности ДПост при МС может стать лептинорезистентность состояние, характерное для МС и обусловленное функциональной несостоятельностью лептинового рецептора. Так, выявлено, что МС, индуцированный высокожировой диетой, приводит к снижению экспрессии белка лептинового рецептора и уменьшению сократительного ответа кардиомиоцита на лептин [39]. При этом следует упомянуть, что введение лептина животным без метаболических нарушений перед моделированием коронароокклюзии приводит к снижению размера инфаркта [40]. Можно предположить, что внутриклеточные механизмы, активируемые лептином, опосредуют кардиопротекцию при кондиционировании, а в условиях лептинорезистентности становятся несостоятельными. Однако эта гипотеза нуждается в дополнительном исследовании.

В научной литературе представлены немногочисленные и противоречивые данные о влиянии МС на экспрессию опиоидных рецепторов и реализацию связанного с ними функционального ответа. Обнаружено, что ожирение приводит к снижению физиологического ответа (повышение артериального давления) на центральное введение опиоидов [41]. В исследовании M.J. Barnes и соавт. (2004) обнаружено усиление гипертонического ответа на активацию центральных опиоидных рецепторов и снижение - в ответ на активацию каппа-опиоидных рецепторов у крыс после 12 нед. высокожировой диеты [42]. Однако в работе H. Lu и соавт. (2000) выявлено повышение подобного ответа на введение бета-эндорфина у крыс после применения высокожировой диеты [43]. В публикации B. Alexandre-Santos и соавт. (2019) продемонстрировано снижение как экспрессии проэнкефалина, так и представительства опиоидных рецепторов в миокарде у крыс, содержащихся на высокожировой диете, что, по-видимому, привело к изменению внутриклеточной регуляции сопряженных с опиоидными рецепторами киназ PI3K, ERK и GSK-3 β и к повышению активности каспазы-3, киназы, индуцирующей апоптоз кардиомиоцитов [44]. Вместе с тем в недавнем исследовании под руководством H.H. Patel обнаружено, что введение морфина в значительной степени предупреждает изменения, развивающиеся при диабете 2-го типа у мышей, такие как гипергликемия, снижение толерантности к глюкозе, гипертрофия миокарда и сердечная недостаточность, усиление постшемической дисфункции миокарда, нарушение митохондриального дыхания, снижение устойчивости митохондрий к Ca²⁺ [45]. Эти данные косвенно свидетельствуют о сохранности опиоидных рецепторов миокарда при диабете 2-го типа и открывают потенциальную возможность применения опиоидов для коррекции И/Р повреждения у пациентов в этом состоянии. Наши исследования показали эффективность применения агониста опиоидных рецепторов дельторфина II у крыс при индуцированном диетой МС, что указывает на состоятельность дельта-опиоидных рецепторов [19].

В отношении влияния МС на внутриклеточный сигнальный механизм ДПост D. Donner и соавт. (2012) показали, что миокард крыс, содержащихся на высокоуглеводной диете, становится более устойчивым к ишемии как *in vivo*, так и на модели тотальной ишемии изолированного сердца [46]. Кардиопротекция в этом исследовании сопровождалась увеличением внутриклеточного протекторного киназного ответа на ишемию – увеличивалась степень фосфорилирования Akt и ERK1/2 киназ, eNOS и GSK3 β . Следует отметить, что примененная диета не привела к развитию гипергликемии и инсулинорезистентности.

В исследовании C. Wang и соавт. (2018) обнаружена состоятельность протекции ДПре у крыс со стрептозотцин-индуцированным диабетом, а сигнальный механизм, включающий PKC- ϵ /STAT3, сохранен [27]. Эти немногочисленные данные свидетельствуют о сохранности внутриклеточного киназного механизма ДПост при МС.

Известно, что нарушения липидного метаболизма приводят к дисфункции митохондрий [47]. Неэффективность нейропротекторного действия фармакологического посткондиционирования при ожирении у крыс может быть связана с нарушением функции митохондриального АТФ чувствительного калиевого канала (митокАТФ-канала). В работе J. Yan и соавт. (2021) обнаружено, что ожирение,

вызванное высокожировой диетой, приводит к значительному подавлению окислительного фосфорилирования, что сопровождается снижением сократимости миокарда [47]. В этой работе выявлено снижение экспрессии PPAR α , регулятора окисления жирных кислот, у крыс с ожирением. При этом показано, что активация PPAR α в некоторой степени (но не полностью) предупреждает подобные нарушения. Таким образом, нарушение метаболизма жирных кислот предположительно может быть одной из причин неэффективности кардиопротекции при ожирении. Однако нам не удалось подтвердить взаимосвязь нарушения липидного обмена (содержания триглицеридов и холестерина) со снижением эффективности ДПост при МС [32].

Известно, что при ожирении происходит снижение активной (фосфорилированной по Thr172) формы AMPK в ткани сердца и печени [48]. Немногочисленные работы позволяют предположить, что изменение активности AMPK при ожирении может играть определенную роль в снижении кардиопротекции при ДПост. Основанием для этого предположения могут служить результаты работ, показавших роль AMPK в снижении эффективности ишемического посткондиционирования [49] у животных с генетическим и обусловленным диетой ожирением.

Одной из значимых причин несостоятельности ДПост при МС может быть влияние метаболических нарушений на работу ионных каналов клетки, претендующих на роль конечного эффектора ДПост. Так, у свиней индуцированный диетой МС приводил к нарушению работы КАТФ-каналов [50]. Подобное нарушение, как показала работа S.J. Jhuo и соавт. (2020), может формироваться при ожирении под действием дисбаланса адипоцитокинов [51]. Однако другие исследования показали увеличение K⁺ тока и усиление образования H₂O₂ в митохондриях печени у мышей после кормления высокожировой диетой, что свидетельствует об активации КАТФ-каналов [52]. В работах группы исследователей из Бразилии в экспериментах на мышцах с повышенным содержанием триглицеридов и свободных жирных кислот в сыворотке крови, происходящем в результате гиперэкспрессии гена аполипоротеина СIII, выявлено усиление активности митоКАТФ [53]. Таким образом, влияние МС, вызванного диетой, на функционирование КАТФ-каналов, а также на другие потенциальные эффекторные структуры остается дискуссионным.

Клинические исследования

Литературные данные о применении ДПост немногочисленны. В 2013 г. H. Zhong и соавт. [54] опубликовали результаты клинического исследования по оценке эффективности ДПост у детей (средний возраст – 3,5 года), которым выполняли операции по поводу врожденных пороков сердца с применением искусственного кровообращения. Посткондиционирование проводили с помощью трех циклов пережатия (5 мин) и реперфузии (5 мин) нижней конечности. В контрольную группу вошли 35 детей, в группу ДПост – 34 пациента. Авторы обнаружили, что ДПост вызывает достоверное снижение уровня маркеров некроза кардиомиоцитов тропонина I, уровня КФК-МВ, способствует поддержанию артериального давления, сокращает время пребывания в стационаре, но не влияет на уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови.

В 2017 г. были опубликованы результаты исследования кардиохирургических больных ($n = 1280$) [55]. Кондиционирование индуцировали с помощью четырех

5-минутных пережатий руки накачиваемой манжетой. Оказалось, что кондиционирование не влияло на частоту нежелательных явлений (смертность, ИМ, инсульт, реваскуляризация).

В 2014 г. F. Prunier и соавт. [56] подтвердили антинекротический эффект ДПост у пациентов с ИМ с подъемом сегмента ST (ИМпST) и чрескожным вмешательством (ЧКВ). Следует отметить, что диагноз диабета был менее чем у 20% пациентов, включенных в это исследование, а индекс массы тела составлял 26–27 кг/м², то есть можно говорить об отсутствии выраженных метаболических нарушений у этих пациентов.

В исследовании, проведенном у пациентов с ИМпST ($n = 83$), ДПост индуцировали четырьмя 5-минутными циклами надувания/сдувания манжеты [57]. Размер инфаркта определяли с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 3–6-е сут после поступления. ДПост уменьшал размер инфаркта и выброс тропонина T по сравнению с контрольной группой. Было обнаружено, что ДПост значительно улучшал индекс спасения миокарда. При этом доля пациентов с артериальной гипертензией была высокой, а индекс массы тела составлял 28–29 кг/м².

В 2013 г. в исследование были включены пациенты со стабильной стенокардией и острым коронарным синдромом, которым выполнялось ЧКВ [58]. Повреждение миокарда оценивали по 24-часовому пику тропонина I. Однако влияния ДПост на этот показатель выявить не удалось. У значительной доли пациентов, включенных в это исследование, наблюдали ожирение (индекс массы тела – 29 кг/м²), дислипидемию (62%), артериальную гипертензию (78%) или диабет (38%).

В проспективное многоцентровое рандомизированное исследование были включены 93 пациента с ИМпST, $n = 93$ [59]. ДПост осуществляли путем 5-минутных циклов надувания и сдувания манжеты вокруг левого бедра. Размер инфаркта и зону риска определяли с помощью МРТ с 4-го по 7-й день. Значимой разницы по пику тропонина T, а также по размеру инфаркта и индексу спасения миокарда, определяемой по МРТ с 4-го по 7-й день, между группами после ДПост и контрольной группой обнаружено не было. В последующем эти авторы проанализировали отсроченную эффективность ДПост и не выявили различий между группами по индексу спасения миокарда и частоте сердечно-сосудистых событий [60]. Важно отметить, что более половины включенных в исследование пациентов имели дислипидемию, гипергликемию или подтвержденный сахарный диабет.

Приведенные данные литературы показывают, что эффективность ДПост в клинических условиях исследована не достаточно. Существуют как данные о его инфаркт-лимитирующей и кардиопротекторной эффективности у пациентов с ОИМ или при кардиохирургических вмешательствах, так и работы, не обнаружившие позитивных эффектов ДПост. Есть основания полагать, что метаболические нарушения могут быть причиной неэффективности ДПост, однако это предположение нуждается в дополнительной проверке.

Заключение

Представленные данные позволяют говорить о том, что механизм ДПост включает триггер, на роль которого могут претендовать аденозин, опиоиды, каннабиноиды, брадикинин, CGRP и субстанция P. Важную роль в сигнальном механизме ДПост играют внутриклеточные

сигнальные механизмы – активация протеинкиназа С, PI3-киназы, киназ Akt и JAK.

В экспериментальных исследованиях метаболические изменения, вызванные диетой, снижают эффективность кардиопротекции при ДПост. В качестве возможных механизмов неэффективности кардиопротекции можно предположить снижение выброса гуморальных факторов, нарушения рецепторного и сигнального звена ДПост, влияние метаболических нарушений на работу КАТФ-ка-

налов, mPTP и на состояние митохондриального дыхания. Однако эти предположения нуждаются в экспериментальном обосновании.

Результаты клинических исследований показывают как наличие антинекротического и инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост при ОИМ и кардиохирургических вмешательствах, так и отсутствие его эффективности. Роль метаболических нарушений в отсутствии эффективности ДПост у пациентов требует обоснования.

Литература / References

- Menees D.S., Peterson E.D., Wang Y., Curtis J.P., Messenger J.C., Rumsfeld J.S. et al. Door-to-Balloon Time and Mortality among Patients Undergoing Primary PCI. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(10):901–909. DOI: 10.1056/NEJMoa1208200.
- Fuernau G., Fengler K., Desch S., Eitel I., Neumann F.J., Olbrich H.G. et al. Culprit lesion location and outcome in patients with cardiogenic shock complicating myocardial infarction: a substudy of the IABP-SHOCK II-trial. *Clin. Res. Cardiol.* 2016;105(12):1030–1041. DOI: 10.1007/s00392-016-1017-6.
- Vinten-Johansen J., Shi W. The science and clinical translation of remote postconditioning. *J. Cardiovasc. Med.* 2013;14(3):206–213. DOI: 10.2459/JCM.0b013e32835cecc6.
- Kerendi F., Kin H., Halkos M.E., Jiang R., Zatta A.J., Zhao Z.Q. et al. Remote postconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 2005;100(5):404–412. DOI: 10.1007/s00395-005-0539-2.
- Li C.M., Zhang X.H., Ma X.J., Luo M. Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand. Cardiovasc. J.* 2006;40(5):312–317. DOI:10.1080/14017430600925292.
- Andreka G., Vertesaljai M., Szantho G., Font G., Piroth Z., Fontos G. et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart.* 2007;93(6):749–752. DOI: 10.1136/hrt.2006.114504.
- Ren X., Roessler A.E., Lynch T.L., 4th, Haar L., Mallick F., Lui Y. et al. Cardioprotection via the skin: nociceptor-induced conditioning against cardiac MI in the NIC of time. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2019;316(3):H543–H553. DOI: 10.1152/ajpcard.00094.2018.
- Fang J., Chen L., Wu L., Li W. Intra-cardiac remote ischemic post-conditioning attenuates ischemia-reperfusion injury in rats. *Scand. Cardiovasc. J.* 2009;43(6):386–394. DOI:10.1080/14017430902866681.
- Ren H.M., Xie R.Q., Cui W., Liu F., Hu H.J., Lu J.C. Effects of rabbit limbs ischemial reperfusion on myocardial necrosis and apoptosis. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2012;28(4):323–327.
- Wei M., Xin P., Li S., Tao J., Li Y., Li J. et al. Repeated Remote Ischemic Postconditioning Protects Against Adverse Left Ventricular Remodeling and Improves Survival in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 2011;108(10):1220–1225. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236190.
- Chen G., Ye X., Zhang J., Tang T., Li L., Lu P. et al. Limb Remote Ischemic Postconditioning Reduces Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NADPH Oxidase Activation and MyD88-TRAF6-P38MAP-Kinase Pathway of Neutrophils. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(12):1971. DOI: 10.3390/ijms17121971.
- Jones W.K., Fan G.C., Liao S., Zhang J.M., Wang Y., Weintraub N.L. et al. Peripheral nociception associated with surgical incision elicits remote nonischemic cardioprotection via neurogenic activation of protein kinase C signaling. *Circulation.* 2009;120(11 Suppl):S1–S9. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843938.
- Breivik L., Helgeland E., Aarnes E.K., Mrdalj J., Jonassen A.K. Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* 2011;106(1):135–145. DOI: 10.1007/s00395-010-0133-0.
- Penna C., Granata R., Tocchetti C., Gallo M., Alloati G., Pagliaro P. Endogenous Cardioprotective Agents: Role in Pre and Postconditioning. *Curr. Drug Targets.* 2015;16(8):843–867. DOI: 10.2174/1389450116666150309115536.
- Wang Z., Wen J., Zhou C., Wang Z., Wei M. Gene expression profiling analysis to investigate the role of remote ischemic postconditioning in ischemia-reperfusion injury in rats. *BMC Genomics.* 2019;20(1):361. DOI: 10.1186/s12864-019-5743-9.
- Bartekova M., Jelemensky M., Dhalla N.S. Emerging role of non-coding RNAs and extracellular vesicles in cardioprotection by remote ischemic conditioning of the heart. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2019;20(2):59. DOI:10.31083/j.rcm.2019.02.54.
- Tang Y., Yang J., Xiang H., Xu J. PI3K-Akt/eNOS in remote postconditioning induced by brief pulmonary ischemia. *Clin. Investig. Med.* 2014;37(1):26. DOI: 10.25011/cim.v37i1.20866.
- Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н. Роль опиоидных рецепторов в механизме кардиопротекторного эффекта дистантного посткондиционирования. *Кардиологический вестник.* 2022;17(2–2):28–29. Muhomedzjanov A.V., Maslov L.N. Rol' opioidnyh receptorov v mehanizme kardioprotektornogo jeffekta distantnogo postkondicionirovaniya. *Kardiologicheskij vestnik.* 2022;17(2–2):28–29. (In Russ.).
- Нарыжная Н.В., Мухомедзянов А.В., Курбатов Б.К., Сиротина М.А., Клилин М., Азев В.Н. и др. Инфаркт-лимитирующая эффективность дельторфина-II при индуцированном диетой метаболическом синдроме у старых крыс. *Acta biomedica scientific.* 2022;7(6):281–289. [Naryzhnaya N.V., Mukhomedzjanov A.V., Kurbatov B.K., Sirotnina M.A., Kilin M., Azev V.N. et al. The infarct-limiting efficacy of deltorphin-II in old rats with diet-induced metabolic syndrome. *Acta biomedical scientific.* 2022;7(6):281–289. (In Russ.)]. DOI: 10.29413/ABS.2022-7.6.29.
- Ling J., Wong G.T.C., Yao L., Xia Z., Irwin M.G. Remote pharmacological post-conditioning by intrathecal morphine: cardiac protection from spinal opioid receptor activation. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2010;54(9):1097–1104. DOI: 10.1111/j.1399-6576.2010.02295.x.
- Xu Y.C., Li R.P., Xue F.S., Cui X.L., Wang S.Y., Liu G.P. et al. κ-Opioid receptors are involved in enhanced cardioprotection by combined fentanyl and limb remote ischemic postconditioning. *J. Anesth.* 2015;29(4):535–543. DOI: 10.1007/s00540-015-1998-8.
- Gao Y., Song J., Chen H., Cao C., Lee C. TRPV1 activation is involved in the cardioprotection of remote limb ischemic postconditioning in ischemia-reperfusion injury rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;463(4):1034–1039. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.054.
- Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Крылатов А.В. Способность каннабиноида HU-210 имитировать феномен ишемического посткондиционирования. *Сибирский медицинский журнал.* 2013;28(3):70–73. [Lishmanov Yu.B., Maslov L.N., Tsubulnikov S.Yu., Krylatov A.V. Ability of cannabinoid HU-210 to mimic ischemic postconditioning phenomenon. *The Siberian Medical Journal.* 2013;28(3):70–73. (In Russ.)].
- Gao Q., Hu J., Hu J., Yu Y., Ye H., Li Z. et al. Calcium activated potassium channel and protein kinase C participate in the cardiac protection of remote post conditioning. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2013;26(2):285–290.
- Mukhomedzjanov A.V., Naryzhnaya N.V., Maslov L.N. The role of protein kinase C and PI3-kinase in the mechanism of the cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning. *Bull. Sib. Med.* 2022;20(4):6–10. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-4-6-10.
- Gao S., Zhan L., Yang Z., Shi R., Li H., Xia Z. et al. Remote Limb Ischaemic Postconditioning Protects Against Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Mice: Activation of JAK/STAT3-Mediated Nrf2-Antioxidant Signalling. *Cell Physiol. Biochem.* 2017;43(3):1140–1151. DOI: 10.1159/000481755.
- Wang C., Li H., Wang S., Mao X., Yan D., Wong S.S. et al. Repeated non-invasive limb ischemic preconditioning confers cardioprotection through PKC-ε/STAT3 signaling in diabetic rats. *Cell Physiol. Biochem.* 2018;45(5):2107–2121. DOI: 10.1159/000488047.
- Malemud C.J. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.* 2018;10(5–6):117–127. DOI: 10.1177/1759720X18776224.
- Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Holt V.E., Silvennoinen O., O'Shea J.J. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.* 2004;5(12):253. DOI: 10.1186/gb-2004-5-12-253.
- Penna C., Andreadou I., Aragno M., Beauloye C., Bertrand L., Lazou A. et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br. J. Pharmacol.* 2020;177(23):5312–5335. DOI: 10.1111/bph.14993.
- Oosterlinck W., Dresselaers T., Geldhof V., Nevelsteen I., Janssens S., Himmelreich U. et al. Diabetes mellitus and the metabolic syndrome do

- not abolish, but might reduce, the cardioprotective effect of ischemic preconditioning. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2013;145(6):1595–1602. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.02.016.
32. Logvinov S.V., Mukhomedzyanov A.V., Kurbatov B.K., Sirotina M.A., Naryzhnaya N.V., Maslov L.N. Participation of leptin and corticosterone in the lack of infarct-limiting efficiency of remote preconditioning and of arterial hypertension at metabolic syndrome in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022;174(9):294–300. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-9-294-300.
 33. Lochner A., Genade S., Genis A., Marais E., Salie R. Long-chain free fatty acids inhibit ischaemic preconditioning of the isolated rat heart. *Mol. Cell Biochem.* 2020;473(1–2):111–132. DOI: 10.1007/s11010-020-03812-9.
 34. Wen Z., Li J., Fu Y., Zheng Y., Ma M., Wang C. Hypertrophic adipocyte-derived exosomal miR-802-5p contributes to insulin resistance in cardiac myocytes through targeting HSP60. *Obesity. (Silver Spring)*. 2020;28(10):1932–1940. DOI: 10.1002/oby.22932.
 35. Nascimento A.F., Luvizotto R.A., Leopoldo A.S., Lima-Leopoldo A.P., Seiva F.R., Justulin L.A.Jr. et al. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci.* 2011;88(23–24):1031–1038. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.03.015.
 36. Recinella L., Orlando G., Ferrante C., Chiavaroli A., Brunetti L., Leone S. Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases. *Front. Physiol.* 2020;11:578966. DOI: 10.3389/fphys.2020.578966.
 37. Russell J.S., Griffith T.A., Helman T., Du Toit E.F., Peart J.N., Headrick J.P. Chronic type 2 but not type 1 diabetes impairs myocardial ischaemic tolerance and preconditioning in C57Bl/6 mice. *Exp. Physiol.* 2019;104(12):1868–1880. DOI: 10.1113/EP088024.
 38. Schram K., Girolamo S., Madani S., Munoz D., Thong F., Sweeney G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2010;15(4):551–563. DOI: 10.2478/s11658-010-0027-z.
 39. Ren J., Zhu B.H., Relling D.P., Esberg L.B., Ceylan-Isik A.F. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity.* 2008;16(11):2417–2423. DOI: 10.1038/oby.2008.381.
 40. Xu T., Liu S., Wang X. Amelioration of myocardial ischemia/reperfusion injury by leptin pretreatment and ischemic preconditioning in mouse. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2010;22(2):105–108.
 41. Hill-Pryor C., Dunbar J.C. The effect of high fat-induced obesity on cardiovascular and physical activity and opioid responsiveness in conscious rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 2006;28(2):133–145. DOI: 10.1080/10641960500468326.
 42. Barnes M.J., Jen K.L.C., Dunbar J.C. The effect of CNS opioid on autonomic nervous and cardiovascular responses in diet-induced obese rats. *Peptides.* 2004;25(1):71–79. DOI: 10.1016/j.peptides.2003.11.009.
 43. Lu H., Buisson A., Jen K.L.C., Dunbar J.C. Leptin resistance in obesity is characterized by decreased sensitivity to proopiomelanocortin products. *Peptides.* 2000;21(10):1479–1485. DOI: 10.1016/S0196-9781(00)00301-6.
 44. Alexandre-Santos B., Machado M.V., Menezes A.C., Velasco L.L., Sepúlveda-Fragoso V., Vieira A.B. et al. Exercise-induced cardiac opioid system activation attenuates apoptosis pathway in obese rats. *Life Sci.* 2019;231:116542. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.06.017.
 45. Zemljic-Harpf A.E., See Hoe L.E., Schilling J.M., Zuniga-Hertz J.P., Nguyen A., Vaishnav Y.J. et al. Morphine induces physiological, structural, and molecular benefits in the diabetic myocardium. *FASEB J.* 2021;35(3):e21407. DOI: 10.1096/fj.201903233R.
 46. Donner D., Headrick J.P., Peart J.N., Du Toit E.F. Obesity improves myocardial ischaemic tolerance and RISK signalling in insulin-insensitive rats. *Dis. Model. Mech.* 2013;6:457–466. DOI: 10.1242/dmm.010959.
 47. Yan J., Song K., Bai Z., Ge R.L. WY14643 improves left ventricular myocardial mitochondrial and systolic functions in obese rats under chronic persistent hypoxia via the PPAR α pathway. *Life Sci.* 2021;266:118888. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118888.
 48. Lindholm C.R., Ertel R.L., Bauwens J.D., Schmuck E.G., Mulligan J.D., Saue K.W. A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats. *J. Physiol. Biochem.* 2013;69(2):165–175. DOI: 10.1007/s13105-012-0199-2.
 49. Bouhidel O., Pons S., Souktani R., Zini R., Berdeau A., Ghaleh B. Myocardial ischemic preconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2008;295(4):H1580–H1586. DOI: 10.1152/ajpheart.00379.2008.
 50. Bender S.B., Tune J.D., Borbouse L., Long X., Sturek M., Laughlin M.H. Altered Mechanism of Adenosine-Induced Coronary Arteriolar Dilation in Early-Stage Metabolic Syndrome. *Exp. Biol. Med.* 2009;234(6):683–692. DOI: 10.3181/0812-RM-350.
 51. Jhuo S.J., Liu I.H., Tsai W.C., Chou T.W., Lin Y.H., Wu B.N. et al. Effects of secretome from fat tissues on ion currents of cardiomyocyte modulated by sodium-glucose transporter 2 inhibitor. *Molecules.* 2020;25(16):3606. DOI: 10.3390/molecules25163606.
 52. Cardoso A.R., Cabral-Costa J.V., Kowaltowski A.J. Effects of a high fat diet on liver mitochondria: Increased ATP-sensitive K⁺ channel activity and reactive oxygen species generation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2010;42(3):245–253. DOI: 10.1007/s10863-010-9284-9.
 53. Alberici L.C., Vercesi A.E., Oliveira H.C.F. Mitochondrial energy metabolism and redox responses to hypertriglyceridemia. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2011;43(1):19–23. DOI: 10.1007/s10863-011-9326-y.
 54. Zhong H., Gao Z., Chen M., Zhao J., Wang F., Li L. et al. Cardioprotective effect of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. *Pediatr. Anesth.* 2013;23(8):726–733. DOI: 10.1111/pan.12181.
 55. Cho Y.J., Lee E.H., Lee K., Kim T.K., Hong D.M., Chin J.H. et al. Long-term clinical outcomes of Remote Ischemic Preconditioning and Postconditioning Outcome (RISPO) trial in patients undergoing cardiac surgery. *Int. J. Cardiol.* 2017;231:84–89. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.12.146.
 56. Prunier F., Angoulvant D., Saint Etienne C., Vermes E., Gilard M., Piot C. et al. The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic preconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 2014;109(2):400. DOI: 10.1007/s00395-013-0400-y.
 57. White S.K., Frohlich G.M., Sado D.M., Maestrini V., Fontana M., Treibel T.A. et al. Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2015;8(1 Pt B):178–188. DOI: 10.1016/j.jcin.2014.05.015.
 58. Carrasco-Chinchilla F., Muñoz-García A.J., Domínguez-Franco A., Millán-Vázquez G., Guerrero-Molina A., Ortiz-García C. et al. Remote ischaemic preconditioning: Does it protect against ischaemic damage in percutaneous coronary revascularisation? Randomised placebo-controlled clinical trial. *Heart.* 2013;99(19):1431–1437. DOI: 10.1136/heartjnl-2013-304172.
 59. Verouhis D., Sörensson P., Gourine A., Henareh L., Persson J., Saleh N. et al. Effect of remote ischemic conditioning on infarct size in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction. *Am. Heart J.* 2016;181:66–73. DOI: 10.1016/j.ahj.2016.08.004.
 60. Verouhis D., Sörensson P., Gourine A., Henareh L., Persson J., Saleh N. et al. Long-term effect of remote ischemic conditioning on infarct size and clinical outcomes in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 2021;97(3):386–392. DOI: 10.1002/ccd.28760.

Благодарности

Авторы выражают признательность д-ру мед. наук, профессору Л.Н. Маслову за консультативную помощь при составлении обзора.

Информация о вкладе авторов

Мухомедзянов А.В. – анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение рукописи для публикации, оформление и отправка рукописи.

Сиротина М.А. – поиск литературы, анализ и интерпретация данных, оформление рукописи.

Acknowledgments

The authors thank Dr. med. Sciences, Professor L.N. Maslov for advisory assistance in compiling the review.

Information on author contributions

Mukhomedzyanov A.V. – data analysis and interpretation, final approval for publication of the manuscript, preparation and sending of the manuscript.

Sirotina M.A. – literature search, data analysis and interpretation, design of the manuscript.

Логвинов С.В. – разработка концепции исследования, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.

Нарыжная Н.В. – разработка концепции и дизайна публикации, сбор, анализ, систематизация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ручаясь за их точность и безупречность.

Сведения об авторах

Мухомедзянов Александр Валерьевич, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии. ORCID 0000-0003-1808-556X.

E-mail: sasha_m91@mail.ru.

Сиротина Мария Александровна, аспирант, младший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-5966-8916.

E-mail: sirotina_maria@mail.ru.

Логвинов Сергей Валентинович, д-р мед. наук, профессор, старший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-9876-6957.

E-mail: s_logvinov@mail.ru.

Нарыжная Наталья Владимировна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-2264-1928.

E-mail: natalynar@yandex.ru.

Мухомедзянов Александр Валерьевич, e-mail: sasha_m91@mail.ru.

Logvinov S.V. – development of the study concept, substantiation of the manuscript and revision of critical intellectual content, final approval of the manuscript for the publication.

Naryzhnaya N.V. – development of the concept and design of the study, data collection, analysis and systematization, substantiation of the manuscript and revision of critical intellectual content, final approval of the manuscript for the publication.

All authors gave their final consent to the submission of the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of the work, vouching for their accuracy and flawlessness

Information about the authors

Alexandr V. Mukhomedzyanov, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-1808-556X.

E-mail: sasha_m91@mail.ru.

Maria A. Sirotnina, Graduate Student, Junior Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-4502-0836.

E-mail: sirotina_maria@mail.ru.

Sergey V. Logvinov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Senior Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Head of Department of Histology and Embryology, Siberian State Medical University. ORCID 0000-0002-9876-6957.

E-mail: s_logvinov@mail.ru.

Natalia V. Naryzhnaya, Dr. Sc. (Med.), Leading Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-2264-1928.

E-mail: natalynar@yandex.ru.

Alexander V. Mukhomedzyanov, e-mail: sasha_m91@mail.ru.

Received January 03, 2023

Поступила 03.01.2023

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-46-57>
УДК 616.11/.127-018.26-056.257-073.43-8-06:616-008.9:616-092.9

Современные методы оценки эпикардальной жировой ткани

Т.Н. Василькова, Т.А. Мищенко

Тюменский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 625023, Российская Федерация, Тюмень, ул. Одесская, 54

Аннотация

Эпикардальная жировая ткань (ЭЖТ) представляет собой депо висцерального жира сердца, обладающее высокой пластичностью и непосредственно контактирующее с миокардом и коронарными артериями. Эпикардальный жир (ЭЖ) является уникальным паракринным органом, тесно анатомически и физиологически связанным с миокардом. Исследования последних лет неоднократно подтвердили роль ЭЖ в прогрессировании заболеваний сердечно-сосудистой системы. Его накопление, измеренное с помощью новых неинвазивных методов визуализации, проспективно связано с началом и прогрессированием ишемической болезни сердца (ИБС) и фибрилляции предсердий. Настоящий обзор посвящен современным методам *in vivo* оценки ЭЖ.

Ключевые слова:	ожирение, эпикардальная жировая ткань, метаболический синдром.
Конфликт интересов:	авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.
Прозрачность финансовой деятельности:	работа выполнена по инициативе авторов без привлечения финансирования.
Для цитирования:	Василькова Т.Н., Мищенко Т.А. Современные методы оценки эпикардальной жировой ткани. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):46–57. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-46-57 .

Recent assessment methods of epicardial adipose tissue

Tatyana N. Vasilkova, Tatyana A. Mischenko

Tyumen State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 54, Odesskaya str., Tumen, 625023, Russian Federation

Abstract

Epicardial adipose tissue (EAT) is a visceral depot of the heart fat, which has high plasticity and directly contact with the myocardium and coronary arteries. Epicardial fat is a unique paracrine organ closely anatomically and physiologically related to the myocardium. Recent studies have repeatedly confirmed the role of epicardial fat in the progression of the cardiovascular diseases. The accumulation of EAT, measured by using new non-invasive imaging techniques, is prospectively associated with the onset and progression of coronary heart disease (CHD) and atrial fibrillation. This review focuses on modern *in vivo* methods for assessing epicardial fat.

Keywords:	obesity, epicardial adipose tissue, metabolic syndrome.
Conflict of interest:	the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the content of this article.
Financial disclosure:	the work was carried out on the initiative of the authors without attracting funding.
For citation:	Vasilkova T.N., Mischenko T.A. Recent assessment methods of epicardial adipose tissue. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):46–57. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-46-57 .

Мищенко Татьяна Андреевна, e-mail: neotanya@mail.ru.

Введение

Исследования последних лет показали, что у лиц даже с нормальным индексом массы тела (ИМТ) присутствует риск сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений, что подтверждается значительной (до 40%) распространенностью висцерального ожирения (ВО) у лиц с нормальным ИМТ и ишемической болезнью сердца (ИБС). У людей с нормальной массой тела и наличием ВО кардиоваскулярный риск выше в 2,75 раза, а риск смерти от всех причин – в 2,08 раза, чем у людей с нормальной массой тела без ВО [1]. Накопленные научные данные позволяют сделать вывод о том, что разные депо висцерального жира могут вносить свой особенный вклад в развитие эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний. Эпикардиальная жировая ткань (ЭЖТ) уникальна по своей анатомии и беспрепятственной близости к сердцу, имеет свой транскриптом и секретом, сильно отличающиеся от других жировых депо. ЭЖТ отличается от остальных жировых депо физиологическими и патологическими свойствами, которые варьируют в зависимости от ее локализации [2]. Таким образом, на сегодняшний день представляет практический интерес разработка алгоритмов измерения и оценки функциональной активности ЭЖТ с последующим включением в интерпретацию сердечно-сосудистого и метаболического рисков.

Роль эпикардиального жира в физиологии сердца в норме и при патологии

ЭЖТ, эпикардиальный жир (ЭЖ), представляет собой истинную висцеральную жировую ткань (ВЖТ) сердца. ЭЖТ расположена между миокардом и висцеральным перикардом и обычно находится в атриовентрикулярных и межжелудочковых бороздах сердца взрослого человека. ЭЖТ происходит из единой с миокардом закладки – спланхноплевральной мезодермы. ЭЖТ состоит из адипоцитов, ганглиев, нервов и воспалительных, стромоваскулярных и иммунных клеток [2, 3]. Между ЭЖТ и миокардом нет мышечной фасции, две ткани имеют общую микроциркуляцию. Отсутствие анатомического барьера позволяет создавать перекрестные взаимодействия между ЭЖТ и прилегающим миокардом [4]. Эпикардиальные адипоциты меньше адипоцитов в подкожных и других висцеральных жировых отложениях из-за большего количества преадипоцитов по сравнению со зрелыми адипоцитами. ЭЖТ составляет 20% массы сердца и 1% от общей жировой массы в физиологических условиях [5].

Физиологически ЭЖТ играет кардиопротекторную роль, обеспечивая механическую защиту, служит источником энергии для миокарда и одновременно буфером, защищающим от липотоксичности при избытке свободных жирных кислот (СЖК). ЭЖТ вырабатывает противовоспалительные адипокины, в частности адипонектин и адреномедуллин, обладающие антиатеросклеротическими и противовоспалительными свойствами [5]. Белок, связывающий жирные кислоты адипоцитов (также известный как FABP4), который высоко экспрессируется в ЭЖТ, участвует во внутриклеточном транспорте жирных кислот из ЭЖ в миокард [6]. Считается, что ЭЖТ обеспечивает прямой источник тепла для миокарда и защищает сердце во время неблагоприятных гемодинамических состояний, таких как ишемия или гипоксия. Недавние исследования показали, что ЭЖТ проявляет черты бежевого жира и экспрессирует разобщающий белок 1 (UCP-1) как на уровне мРНК, так и на уровне белка [7]. Однако этот термоген-

ный потенциал может быть утрачен с возрастом, появлением ожирения и развитием ИБС. С возрастом эпикардиальные адипоциты становятся более восприимчивыми к факторам окружающей среды, метаболическим и гемодинамическим факторам, которые постепенно изменяют функцию ЭЖТ с термогенеза на накопление энергии. Доля коричневых адипоцитов снижается в пользу однонездных белых адипоцитов у пожилых людей [8, 9].

Считается, что механизмы патологического воздействия ЭЖТ при увеличении ее объема опосредованы вазокринной или паракринной секрецией провоспалительных адипокинов и СЖК, чему способствует отсутствие фасций, разделяющих ЭЖТ и миокард [2]. Паракринная передача сигналов предполагает, что адипокины, продуцируемые ЭЖТ, диффундируют непосредственно через слои (адвентицию, медию и интиму) сосудистой стенки, а также интерстициальную жидкость для взаимодействия с гладкими мышцами [10]. Гипотеза вазокринной сигнализации подразумевает, что адипокины и СЖК напрямую попадают в *vasa vasorum* и транспортируются вниз по течению в артериальную стенку [11]. Но совсем недавно был обнаружен новый способ коммуникации с участием внеклеточных везикул (ВВ), содержащих различные цитокины и микроРНК.

В своей статье О. Shaihov-Терег и соавт. [12] продемонстрировали, что ЭЖТ способна воздействовать на ВВ, несущие провоспалительные, профибротические и проаритмические молекулы в предсердиях. Среди биоактивных молекул особого внимания заслуживают интерлейкины (ИЛ) (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), адипонектин, ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), адреномедуллин, фосфолипаза А2, фактор некроза опухоли α (ФНО- α), моноцитарный хемоаттрактивный белок 1 (MCP-1), оментин, лептин, висфатин, резистин [13]. Хотя некоторые из этих молекул, такие как адипонектин или оментин, обладают физиологически положительными эффектами, дисбаланс между защитными и вредными адипокинами, секретируемыми ЭЖТ, может участвовать в провоспалительном фенотипе, связанном с дисфункцией эндотелия и атерогенезом [14].

Следует отметить, что ЭЖТ неравномерно распределена по всему сердцу, и ее региональное распределение не является случайным. ЭЖТ, окружающая левое предсердие, отличается от ЭЖТ, инфильтрирующей коронарные артерии. Каждое локальное депо ЭЖТ имеет свой транскриптом и протеом и, следовательно, по-разному влияет на соседние структуры сердца [15].

На основании этих данных будет корректным рассматривать ЭЖТ как эндокринный орган с локальным влиянием на сердце.

Оценка ЭЖТ с помощью ультразвуковых методов исследования (УЗИ)

Методы визуализации являются неотъемлемой частью современной кардиологии. ЭЖТ можно оценить с помощью традиционных и новых методов [9]. Толщину ЭЖТ можно визуализировать и измерить с помощью стандартной 2D-эхокардиографии (ЭхоКГ).

В ряде исследований доказано, что толщина ЭЖТ – это суррогатный маркер общего объема ЭЖТ. Доказано, что толщина ЭЖТ, измеренная при ЭхоКГ, коррелирует с объемом абдоминального жира, определенным по мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) [2]. Показана высокая корреляционная связь толщины ЭЖТ, из-

меренной с помощью ЭхоКГ, с объемом ЭЖТ, оцененным с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), с коэффициентом корреляции $r = 0,910$; $p = 0,001$ [15].

Также было выявлено, что увеличение объема ЭЖТ связано с увеличением объема абдоминальной жировой ткани, содержания триглицеридов в миокарде и печени, диагностированного с помощью магнитно-резонансной спектроскопии [16]. Количество ЭЖТ коррелирует с объемом жировых отложений в миокарде и печени, визуализируемых с помощью спектроскопии [17].

В методике, впервые предложенной и описанной G. Iacobellis и соавт. в 2003 г., толщина ЭЖТ при ЭхоКГ измерялась на свободной стенке правого желудочка (ПЖ) в парастернальной проекции как по длинной, так и по короткой оси. ЭЖТ обычно идентифицируют как эхонегативное пространство между наружной стенкой миокарда и висцеральным слоем перикарда, но ЭЖТ также может проявляться как эхоплотное пространство, когда присутствует воспаление или большое количество ЭЖТ. Измерение ЭЖТ ПЖ было выбрано потому, что эта точка признана самой высокой абсолютной толщиной слоя ЭЖ, а парастернальные проекции по длинной и короткой оси позволяют наиболее точно измерить ЭЖТ ПЖ с оптимальной позиций для курсора. Даже когда отмечалась гипертрофия ПЖ, это не мешало измерению ЭЖТ [2].

Исследование оптимально проводить в конце систолы по линии, максимально возможно перпендикулярной аортальному кольцу (месту отхождения восходящей аорты). Однако гораздо большая толщина ЭЖТ может быть измерена справа от кольцевой плоскости аорты из-за крутого нисходящего изгиба свободной стенки ПЖ по мере приближения к проксимальному отделу восходящей аорты. Измерения следует проводить в 3 последовательных сердечных сокращениях (фиксируется среднее значение), рисунок 1.

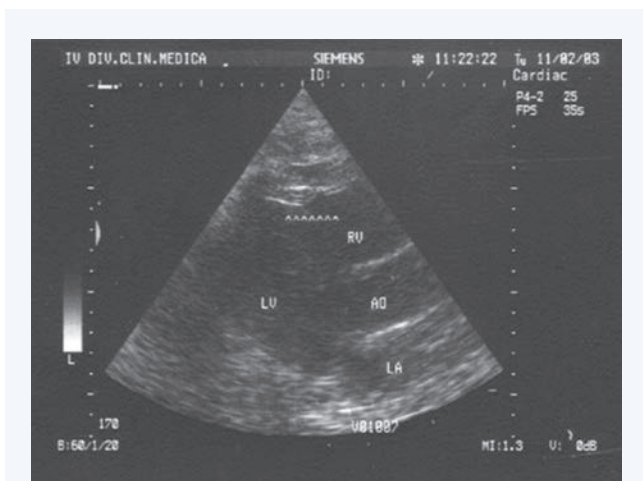


Рис. 1. Эхокардиографическое изображение эпикардиальной жировой ткани (белые стрелки) [17]

Fig. 1. Echocardiographic imaging of epicardial adipose tissue (white arrows) [17]

Т.Ю. Кузнецовой и соавт. (2017 г.) в качестве критерия эпикардиального (висцерального) ожирения указаны следующие значения толщины эпикардиального жира (ТЭЖ) по данным ЭхоКГ: ≥ 5 мм для лиц моложе 45 лет, ≥ 6 мм для лиц от 45 до 55 лет, ≥ 7 мм для лиц старше 55 лет [18].

В исследовании, проведенном в 2016 г., ТЭЖ изучалась как предиктор сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с фибрилляцией предсердий (сердечно-сосудистая смерть, госпитализация по поводу сердечной недостаточности, инфаркт миокарда, мозговой инсульт). По результатам многофакторного анализа, ТЭЖ, превышающая 6 мм (относительный риск 1,211, 95% ДИ 1,084–1,351; $p < 0,001$), была ассоциирована с развитием сердечно-сосудистого события, при этом на каждый 1 мм ТЭЖ увеличение риска составило 1,224 (95% ДИ 1,096–1,368; $P < 0,001$) [19].

У 72 пациентов с преобладающим центральным накоплением жировой ткани, имеющих по крайней мере два клинических и метаболических параметра метаболического синдрома, была показана более высокая толщина ЭЖТ по данным ЭхоКГ, чем у лиц с преимущественным периферическим распределением жира и без клинических или метаболических изменений. Было обнаружено, что толщина ЭЖТ имеет положительную линейную корреляцию с диастолическим артериальным давлением, инсулином натощак, холестерином липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), глюкозой и систолическим артериальным давлением. В этом же исследовании толщина ЭЖТ имела отрицательную линейную корреляцию с адипонектином плазмы и холестерином ЛПВП. Согласно множественному регрессионному анализу, диастолическое артериальное давление и уровень инсулина натощак были переменными, наиболее сильно коррелировавшими с толщиной ЭЖТ. В данном исследовании не было обнаружено корреляции с ЭЖТ и триглицеридами плазмы, С-реактивным белком, фибриногеном, частотой сердечных сокращений, мочевой кислотой или микроальбуминурией [17].

В метаанализе 2012 г. девяти исследований ЭхоКГ-толщины ЭЖТ у пациентов с метаболическим синдромом (МС) и без него, объединившем 2027 субъектов, из которых 1030 имели МС, толщина ЭЖТ была значительно выше у пациентов с МС. Этот метаанализ показал, что пациенты с МС, как правило, были старше. Также было обнаружено, что разница в толщине ЭЖТ была более выраженной у неиспаноязычных белых субъектов, за которыми следовали латиноамериканцы, турки и азиаты [20, 21]. Следовательно, измерение ЭЖТ представляет собой эффективный подход к выявлению пациентов с высоким риском МС и его последствий.

В ряде исследований увеличение количества ЭЖТ было связано с увеличением массы левого желудочка (ЛЖ) и аномальной геометрией или субклинической дисфункцией ПЖ. У пациентов без сердечно-сосудистых заболеваний масса ЛЖ коррелировала с толщиной ЭЖТ, измеренной с помощью ЭхоКГ. Это согласуется с результатами аутопсии, которые предполагают, что увеличение массы миокарда при гипертрофии как ЛЖ, так и ПЖ связано с пропорциональным увеличением массы ЭЖТ [2]. Увеличение массы ЛЖ и гипертрофия ЛЖ являются независимыми факторами риска сердечно-сосудистой и общей смертности, поэтому можно предположить, что прирост ЭЖТ вызывает дополнительную нагрузку на оба желудочка, что может привести к гипертрофии ЛЖ. Такие инновационные методы, как ЭхоКГ с отслеживанием спеклов (Speckle Tracking Echocardiography – STE) и сердечно-сосудистый магнитный резонанс (CMR), позволили изучить сердечную механику, такую как напряжение, скручивание и синхронность сокращений, и выявить связь объема

ЭЖТ и тонких аномалий в сердечной структуре и сократительной способности. В исследовании с использованием STE увеличение толщины ЭЖТ ассоциировалось с продольной деформацией, диссинхронией ЛЖ, циркулярной диссинхронией ЛЖ и скручиванием ЛЖ [22].

Ультразвуковая оценка толщины ЭЖТ имеет несколько несомненных преимуществ, но также и некоторые ограничения. Из положительных свойств ультразвукового исследования (УЗИ) в оценке ЭЖТ можно выделить простоту, безопасность, доступность широкому кругу медицинских учреждений, быстроту исполнения и хорошую воспроизводимость, возможность безопасной многократной оценки толщины ЭЖТ в динамике как маркера эффективности проводимой терапии. Из недостатков следует отметить то, что УЗИ обеспечивает линейное измерение, а не объемное. Результаты ультразвукового обследования операторозависимы, что может повлиять на воспроизводимость. Кроме того, с помощью ультразвука невозможно визуализировать ЭЖТ, расположенную в атриовентрикулярной борозде, или ЭЖТ периатриальной, перикоронарной локализации. У пациентов с тяжелым ожирением и МС может быть плохое акустическое окно, не позволяющее оптимально визуализировать толщину ЭЖТ. В недавних исследованиях было установлено, что показатель плотности ЭЖТ, измеренный с помощью компьютерной томографии (КТ), также является маркером воспаления жировой ткани и потенциальным предиктором ИБС [23]. Однако метод КТ является более дорогостоящим, чем ЭхоКГ, он сопряжен с лучевой нагрузкой на больного.

Мультиспиральная компьютерная томография в оценке эпикардиального жира

МСКТ с контрастным усилением и без контрастного усиления используется для количественной оценки ЭЖТ [23]. Сочетание высокого пространственного разрешения, объемного охвата всего сердца и растущей доступности инструментов программного анализа делает использование КТ идеальным для измерения ЭЖТ.

МСКТ органов грудной клетки без контрастирования позволяет определить толщину ЭЖТ (тЭЖТ) и ее объем, измерять региональное расположение ЭЖТ (т. е. периатриальное, перикоронарное), оценить плотность ЭЖТ в единицах Хаунсфилда, измерять толщину и объем перикардиальной жировой ткани. При полуавтоматическом измерении производится расчет объемов через несколько контрольных срезов. Жир внутри перикарда классифицируется как ЭЖ, а в пределах внутренней грудной ямки как перикардиальный. При определении ЭЖТ с помощью КТ воспроизводимость составляет $\geq 0,98$ при проведении исследования на одном и том же аппарате. Инструменты искусственного интеллекта (ИИ), использующие подход глубокого обучения, применяемые к КТ, позволяют ускорить первые этапы предварительной обработки изображений и улучшить количественную оценку и объемную сегментацию ЭЖТ [24].

Радиомика – перспективный метод получения количественных данных из диагностических изображений, который может применяться для ранней диагностики и прогнозирования при различных заболеваниях сердца. В исследовании Е.В. Попова и соавт. (2021) [25], включавшем 68 пациентов с ИБС и 15 пациентов контрольной группы, на бесконтрастных КТ-изображениях сердца определяли радиомические характеристики ЭЖТ с по-

мощью программного обеспечения 3D-Slicer и модуля SlicerRadiomics (версия 4.10.2). Сравнительный анализ радиомических показателей ЭЖТ у пациентов с ИБС и пациентов контрольной группы показал наличие статистически значимых различий: высокий уровень серого (high gray level emphasis – HGLE) 28,05 (26,51; 29,32) и 30,03 (29,45; 30,49), отклонение уровня серого (gray level variance – GLV) 1,89 (1,78; 1,99) и 2,36 (2,30; 2,48), размер зоны неоднородности (size zone nonuniformity – SZN) соответственно, для всех показателей $p < 0,001$.

J. Ilyushenkova и соавт. (2022) [26] продемонстрировали, что у больных с изолированной фибрилляцией предсердий (ФП) 45 из 93 рассчитанных рентгенологических признаков, объем и затухание ЭЖТ достоверно различались между пациентами с изолированной ФП и лицами без аритмии. При многофакторном регрессионном анализе в подгруппах пациентов с рецидивом и без рецидива ФП только нормированная неоднородность уровня серого (gray level nonuniformity normalized – GLSZM) была независимым предиктором рецидива ФП (ОШ 1,0027; 95% ДИ 1,0009–1,0044; $p = 0,002$). Данные ROC-анализа показали, что $GLSZM > 1227,4$ указывает на высокую вероятность рецидива ФП в течение 12 мес. (чувствительность 89,4%, специфичность 70,8%, AUC: 0,809; $p = 0,001$).

Плотность ЭЖТ является маркером как ЭЖТ, так и общего воспаления. Индекс КТ-плотности (радиоденсивности) ЭЖТ находится в диапазоне от -45 до -195 HU, где меньшее отрицательное значение означает более высокую плотность. Существуют различия в характеристике индекса радиоденсивности ЭЖТ в зависимости от наличия или отсутствия йодсодержащего контраста и воспалительного статуса. Рентгенографическая плотность жира определяется гипертрофией, гиперплазией и фиброзом адипоцитов, которые противоположно влияют на затухание сигнала КТ от жира. Гипертрофические и гиперпластические жировые отложения обычно имеют низкую плотность [27]. Повышенная плотность ЭЖТ, зарегистрированная у пациентов с ИБС или тяжелой формой COVID-19, может быть вызвана воспалением и фиброзом [28].

Преимущества МСКТ в оценке ЭЖТ и сердечно-сосудистого риска неоднократно подтверждались в исследованиях. В метаанализ, проведенный с января 2000 по май 2022 гг., было включено в общей сложности 21 исследование, выполненное на 4975 субъектах, из которых у 2377 была диагностирована ИБС, а остальные 2598 были отнесены к группе без ИБС. Субъекты в группе ИБС были дополнительно разделены на группу больных с тяжелыми стенозами коронарных артерий (стеноз $\geq 50\%$, $n = 846$) и группу легкого/умеренного стеноза (стеноз $< 50\%$, $n = 577$). Как объем, так и толщина ЭЖТ в группе ИБС были больше по сравнению с группой без ИБС ($p < 0,00001$). Толщина ЭЖТ оценивалась по данным МСКТ. При этом группа с тяжелыми стенозами коронарных артерий имела больший объем и толщину ЭЖТ по сравнению с группой с легким/умеренным стенозом ($p < 0,001$). Таким образом, увеличение толщины ЭЖТ у пациентов с ИБС было связано с тяжестью заболевания. Полученные результаты позволяют предположить, что ЭЖТ является новым предиктором и потенциальной терапевтической мишенью для ИБС [29].

В когортном исследовании Heinz Nixdorf Recall [30] частота фатальных или нефатальных коронарных событий значительно увеличивалась на quartиль увеличения

объема ЭЖТ. Исследование MESA [31] (и другие крупные популяционные исследования) показали независимую связь между объемом ЭЖТ и частотой серьезных неблагоприятных сердечных событий.

По сравнению с общим кардиальным ожирением локальное накопление жира вокруг коронарных артерий может иметь более прямое влияние на ИБС. В работе G. Maimaituxun и соавт. (2018) [32] исследователи сравнили значимость толщины локальной ЭЖТ и общий объем жировой ткани сердца в прогнозе ИБС (рис. 2). В общей сложности 197 последовательных пациентов были обследованы при помощи 320-срезовой МСКТ коронарографии и были разделены на группы с ИБС (стеноз 1 ветви коронарной артерии $\geq 50\%$) и без ИБС. Толщина ЭЖТ измерялась в области правой коронарной артерии (ПКА), левой передней нисходящей артерии (ЛПНА) и левой огибающей артерии (ЛОА). Хотя толщина ЭЖТ

ПКА и ЭЖТ ЛОА не различалась между двумя группами, толщина ЭЖТ ЛПНА была больше в группе ИБС, чем в группе без ИБС ($5,45 \pm 2,16$ против $6,86 \pm 2,19$ мм, $p < 0,001$). В многофакторном анализе толщина ЭЖТ ЛПНА была тесно связана с наличием ИБС ($r = 0,276$; $p < 0,001$) и степенью стенозирования коронарных артерий по шкале Gensini ($r = 0,239$; $p < 0,001$).

При множественном регрессионном анализе оценка риска Framingham в сочетании с толщиной ЭЖТ ЛПНА была сильным предиктором ИБС (скорректированный $r_2 = 0,121$; $p < 0,001$). На основании этих данных авторы сделали вывод о том, что толщина локальной жировой ткани, окружающей переднюю межжелудочковую ветвь, является простым и полезным суррогатным маркером для оценки наличия, тяжести и распространенности ИБС независимо от классических сердечно-сосудистых факторов риска.

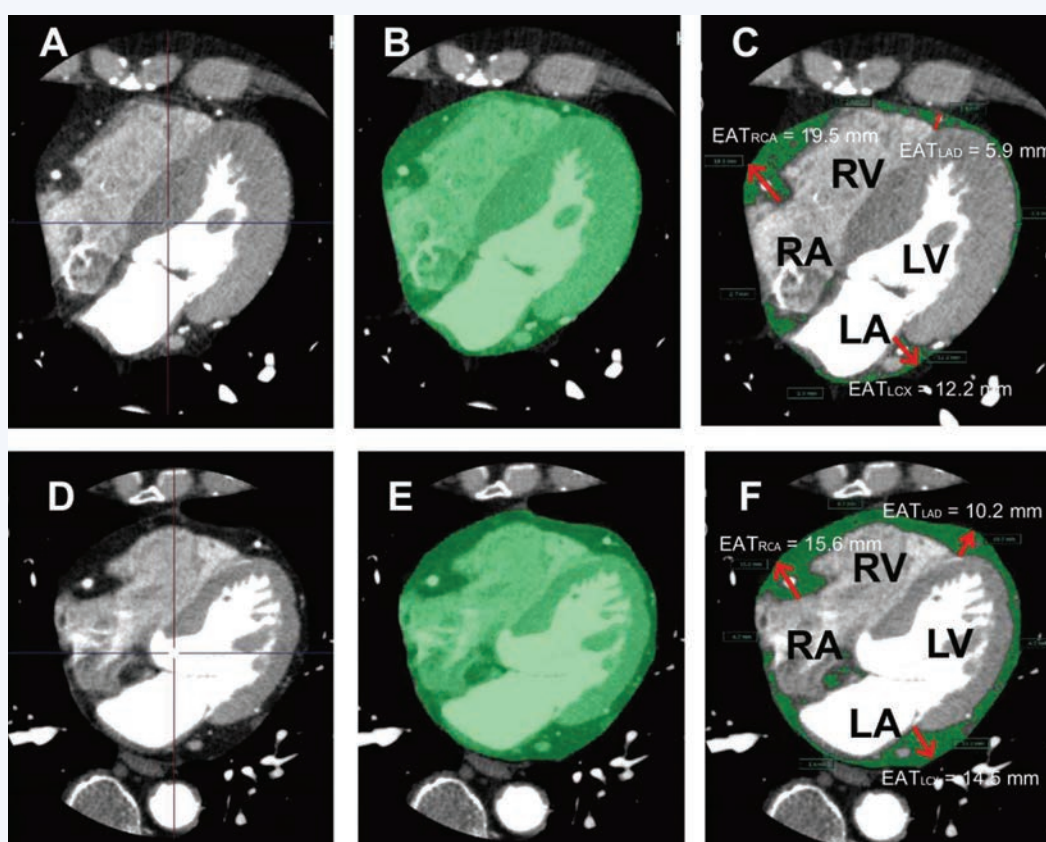


Рис. 2. Мультиспиральная компьютерная томография сердца. Оценка локальной толщины эпикардиальной жировой ткани [32]
Fig. 2. Multispiral computed heart tomography. Measurements of local epicardial adipose tissue thickness [32]

Сосудистое воспаление является ключевым компонентом атеросклеротического процесса и, как было показано, вызывает молекулярные, транскрипционные и структурные изменения в периваскулярном жире. Инновационная методика анализа КТ-коронароангиограмм включает оценку индекса (CT fat attenuation index FAI), представляющего собой меру плотности ЭЖТ, выраженную в единицах Хаунсфилда (HU). Данный инструмент визуализации измеряет взвешенные 3D-градиенты затухания ЭЖ в периваскулярном пространстве, путем использования алгоритмов ИИ, обеспечивающих точные

и воспроизводимые измерения затухания в 1-миллиметровых 3D-слоях ЭЖТ вокруг артериальной стенки человека. FAI отражает транскрипционные, метаболические и фенотипические изменения в периваскулярном жире. FAI может дать информацию о локальном воспалении коронарных артерий, уязвимости бляшек и прогнозировать раннюю субклиническую стадию ИБС *in vivo*. [33]. В исследовании CRISP-CT пациенты с самыми высокими значениями FAI коронарных сосудов имели значительно более высокий риск смертности от всех причин и сердечной смертности [34].

При ИБС увеличение объема жировой ткани миокарда и сосудов ассоциировано с массивным кальцинозом. Уровень кальция в коронарных артериях (кальциевый индекс – КИ) > 10 связан с более высоким объемом ЭЖТ, что может предсказывать риск атеросклероза с чувствительностью и специфичностью 72 и 70% соответственно [35]. В исследовании Н.К. Брель и соавт. (2020 г.), включавшем 125 пациентов с ИБС, кальциноз коронарных артерий выявлен у 95,2% обследованных. При массивном кальцинозе отмечены более высокие показатели толщины ЭЖТ ПЖ и ЛЖ, толщины перикардальной жировой ткани на уровне ствола левой коронарной, передней нисходящей, огибающей артерий [36]. В исследовании EPICHEART высокие значения объема ЭЖТ были независимо связаны с высоким показателем КИ у мужчин, но не у женщин [37]. В когортном исследовании Heinz Nixdorf Recall большой объем ЭЖТ был ассоциирован с прогрессированием кальцификации коронарных артерий, особенно у молодых (возраст < 55 лет) людей и у лиц с ожирением 1-й степени [38].

Магнитно-резонансная томография в оценке эпикардального жира

С помощью МРТ объем ЭЖТ измеряется в двух проекциях: из трансверсальной четырехкамерной позиции и из позиции короткой оси сердца. Объем ЭЖТ вычисляется сложением тЭЖТ, измеренной по длинной и короткой оси. С помощью МРТ ЭЖТ может быть охарактеризована линейной толщиной в различных участках миокарда (рис. 3) или общим объемом (рис. 4). В ряде исследований с помощью МРТ проводилось измерение линейной тЭЖТ в атриовентрикулярной борозде — месте его наибольшего скопления. Измерения на МРТ изображений выполняются в конце диастолы в горизонтальном срезе по длинной оси сердца. Толщина ЭЖТ определяется на участке максимального скопления жира от миокарда перпендикулярно перикарду. Также можно измерять внутримиокардиальное содержание липидов с помощью H-магнитно-резонансной спектроскопии.

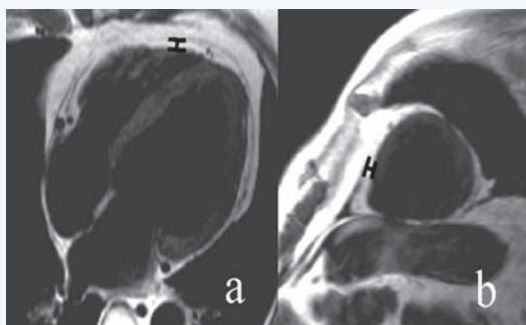


Рис. 3. Магнитно-резонансная томография. Измерение толщины эпикардальной жировой ткани [15]
Fig. 3. Magnetic resonance imaging. The epicardial adipose tissue thickness measurement [15]

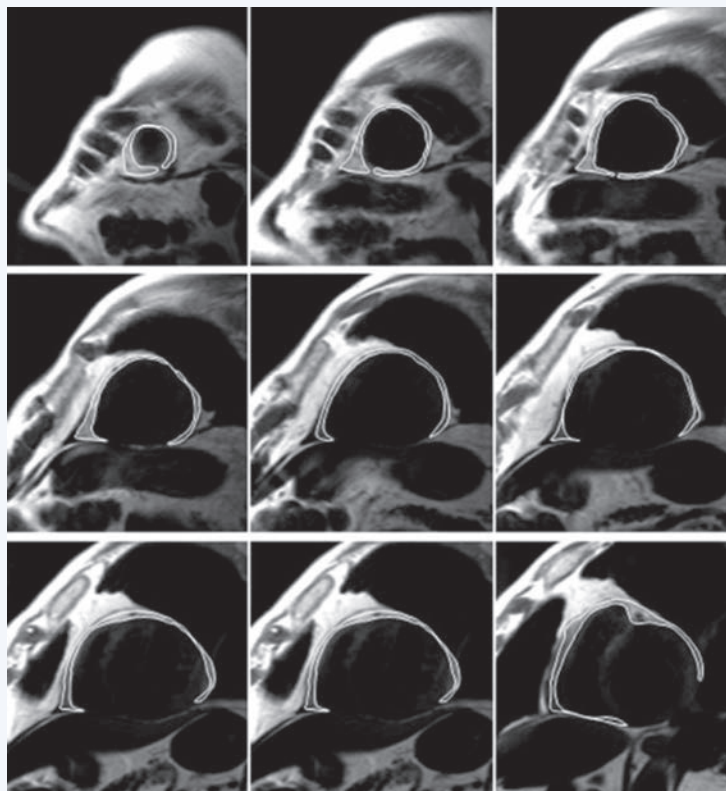


Рис. 4. МРТ. Измерение объема эпикардального жира [15]
Fig. 4. Magnetic resonance imaging. The measurement of epicardial fat volume [15]

Современные методы оценки бурой жировой ткани

Стандартизированные и воспроизводимые неинвазивные методы визуализации для оценки массы и активации бурой жировой ткани (БЖТ) могут значительно помочь в мониторинге терапевтического прогресса, связанного с БЖТ. В отличие от белой жировой ткани, бурые адипоциты имеют отличительные особенности, включая многокамерные липидные капли, большое количество митохондрий и высокую экспрессию разобщающего белка-1 (UCP-1), а также обильную капиллярность. Эти гистологические характеристики дают возможность дифференцировать БЖТ от белой с использованием методов визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), МРТ, флуоресцентная визуализация в ближней инфракрасной области (NIRF) и УЗИ [39].

ПЭТ является наиболее часто используемым методом визуализации для оценки БЖТ. На поверхности адипоцитов БЖТ экспрессируются β 3-адренорецепторы, их активация приводит к усилению внутриклеточного метаболизма и теплопродукции, обеспечивая возможность визуализации. ПЭТ-трассеры, нацеленные на БЖТ, были разработаны в соответствии с ее уникальными характеристиками, включая плотную упаковку митохондрий, высокую метаболическую активность и высокую экспрессию уникальных белков, таких как разобщающий белок-1 (UCP-1) и белок-транслокатор (TSPO).

18-ФДГ-ПЭТ-КТ (ПЭТ с 18F-фтордезоксиглюкозой (18F-ФДГ), совмещенная с КТ) в настоящее время является наиболее часто используемым и хорошо зарекомендовавшим себя методом визуализации активированной БЖТ у человека. Проникая в адипоцит через GLUT-переносчики, 18F-ФДГ претерпевает превращение в ФДГ-6-фосфат, который аккумулируется в цитоплазме, отражая степень выраженности энергозатратных процессов. Однако 18-ФДГ-ПЭТ-КТ не может обнаружить массу БЖТ

без стимуляции, включая холодовую температуру и медикаментозное лечение. В ранних исследованиях использовалась холодовая проба, когда испытуемых помещали в помещение с пониженной температурой воздуха, чем достигалась стимуляция теплопродукции, в первую очередь за счет липолиза БЖТ.

Существенным ограничением данного подхода являлась его нестандартизованность. Применение неселективных (норадреналин и адреналин) и неселективных (мирабегрон) агонистов β 3-адренорецепторов решило данную проблему [40]. Исследования с 18-фтор-дезоксиглюкозой у людей были стандартизированы в критериях BARCIST 1.0 для количественной оценки БЖТ. Хотя 18-ФДГ-ПЭТ-КТ может обнаруживать метаболическую активность ЭЖТ, этот метод не является экономически эффективным или легкодоступным. [41]. Метод сопряжен с воздействием ионизирующего излучения на пациентов и требует наличия дорогостоящего оборудования. Кроме того, обнаружение БЖТ невозможно без стимуляции (холодовой активации в течение 2 ч или индукции β 3-адреномиметиком), а поглощение 18-ФДГ миокардом препятствует обнаружению бурой ЭЖТ [42].

В проспективном исследовании с повторным тестированием, выполненном в 2019 г., оценивалась воспроизводимость нескольких важных количественных показателей БЖТ висцеральных депо. После холодовой активации 24 субъекта были обследованы при помощи ПЭТ/КТ и ПЭТ/МРТ с использованием 18F-фтордезоксиглюкозы. Повторная визуализация происходила в течение 14 дней по идентичному протоколу. Объемы БЖТ сильно коррелировали между сеансами ПЭТ/КТ (коэффициент внутриклассовой корреляции [ICC], 0,85) и ПЭТ/МРТ (ICC, 0,82). Большая продольная вариабельность показателей БЖТ, вероятно, была связана с биологическими факторами, присущими БЖТ, метаболическими колебаниями всего тела или временными различиями в эффективности холодовой активации, а не факторами визуализации (рис. 5) [43].

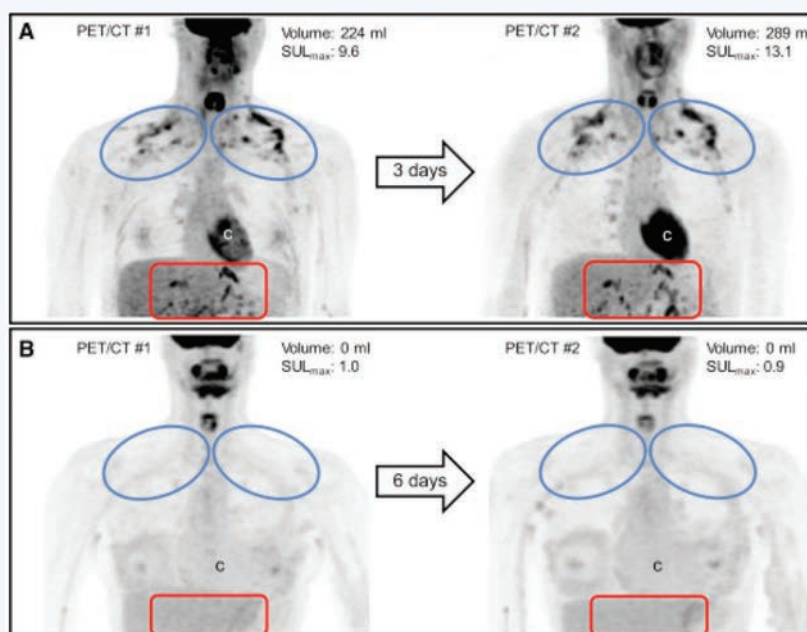


Рис. 5. ПЭТ-КТ с 18F-ФДГ. Визуализация бурой жировой ткани [43]
Fig. 5. 18-FDG-PET/CT. Visualization of brown adipose tissue [43]

Будущие исследования с использованием этих показателей визуализации для отслеживания реакции БЖТ на вмешательство должны учитывать эту вариацию при рассмотрении размера выборки и критериев ответа. Кроме того, следует отметить, что накопление 18ФДГ не дает информации об общем окислительном метаболизме БЖТ, но использование в качестве радиофармпрепаратов меченных жирных кислот и индикаторов на основе кислорода может предоставить недостающую информацию [44].

Радиофармпрепараты для ПЭТ, включая 14(R,S)-[18F] фтор-6-тиагептадекановую кислоту [поглощение неэтерифицированных жирных кислот (NEFA)] [44], 11-С-ацетат (окислительная активность) [45] и 15O-O₂ (оценка потребление БЖТ) [46], которые вовлекаются в метаболизм БЖТ, также использовались для обнаружения активации БЖТ. Их накопление в БЖТ увеличивалось после воздействия холода. Интересно, что в отличие от ПЭТ-изображения с 18F-ФДГ, накопление в сердце 18F-FBnTP (18F-фторбензилтрифенилфосфония) [47] обратно коррелировали с активацией БЖТ. Сообщается, что FF-DA (аналог дофамина) способен визуализировать БЖТ в термонеutralных условиях; однако не было исследовано, будет ли его поглощение в БЖТ зависеть от холода или лекарственной стимуляции.

J. Yang и соавт. в 2017 г. обнаружили, что комбинация 64CuCl₂ с одобренным FDA лекарством от алкоголизма, дисульфирамом (64 Cu-Dis), обеспечивает значительную высокую контрастность для БЖТ. Мишенью для препарата является транспортный белок, расположенный на внешней митохондриальной мембране. Важно отметить, что на высокое поглощение 64 Cu-Dis БЖТ не влияла активация БЖТ [48].

Магнитно-резонансная томография в оценке бурой жировой ткани

По сравнению с ПЭТ и ОФЭКТ МРТ является более привлекательным методом исследования БЖТ, позволяющим без воздействия на пациента ионизирующего излучения изучить объем и функцию БЖТ.

Уникальная структура БЖТ с многокамерными каплями масла, плотными митохондриями и обильными капиллярами обеспечивает уникальную основу для МРТ для выборочного изображения БЖТ с помощью различных механизмов создания контраста изображения. Сообщается, что МРТ может отображать распределение, структуру и функцию БЖТ с помощью различных протоколов записи. МРТ с химическим сдвигом, такая как картирование жировой фракции и T₂*-взвешенное картирование, позволяла измерять объем БЖТ, в то время как МРТ, зависящая от уровня кислорода в крови (blood oxygen level dependent, BOLD), МРТ с гиперполяризованным ксеноном и МРТ с контрастным усилением использовались для оценки функции БЖТ. Для изучения метаболической активности БЖТ с помощью BOLD MRI можно было измерить эффекты оксигенации БЖТ [49]. МРТ с контрастным усилением может измерять перфузию БЖТ [50].

МРТ с химическим сдвигом позволила одновременно картировать жировую фракцию протонной плотности (PDFF) и T₂* для жировой ткани (рис. 6). Сообщалось о БЖТ с более низкой PDFF и более коротким T₂* по сравнению с белой жировой тканью [51]. МРТ с химическим сдвигом широко применялась для дифференциации БЖТ от белой жировой ткани; однако остается неясным,

могут ли PDFF и T₂* МРТ оценивать объем БЖТ независимо от активации.

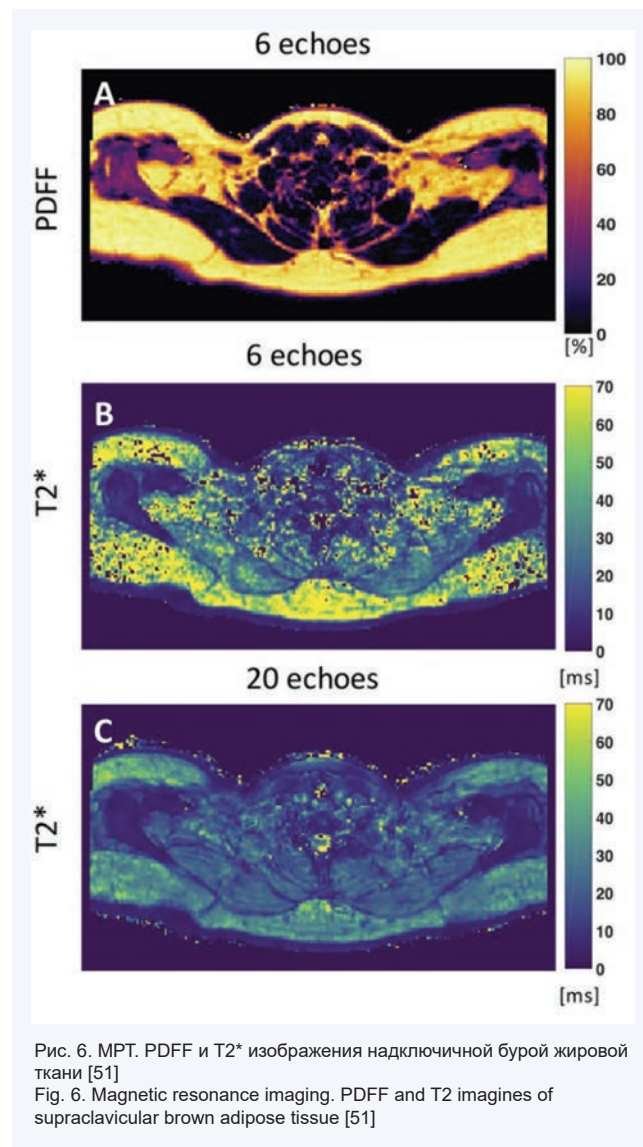


Рис. 6. МРТ. PDFF и T₂* изображения надключичной бурой жировой ткани [51]
Fig. 6. Magnetic resonance imaging. PDFF and T₂ imagines of supraclavicular brown adipose tissue [51]

Кроме того, для визуализации БЖТ разрабатываются новые методы, такие как спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона (NIRS) и инфракрасная термография (infrared thermography, IRT). Эти два метода относительно недороги, и для методов NIRS не требуется холодного воздействия, хотя оба они, и особенно IRT, не могут оценить общий объем БЖТ [52].

Возможности спектроскопии в ближней инфракрасной области (Near-infrared spectroscopy, NIRS) в дифференцировке бурой жировой ткани

В отличие от ПЭТ и МРТ флуоресцентная визуализация в ближней инфракрасной области (NIRS) нерадиоактивна, проста в использовании и относительно недорога, и эти преимущества делают ее более подходящей для крупномасштабных доклинических исследований на животных.

Два метода спектроскопии в ближней инфракрасной области (NIRS) обычно использовались для мониторинга

га свойств БЖТ: спектроскопия в ближней инфракрасной области с временным разрешением (Near-Infrared Time-Resolved Spectroscopy, NIRTRS), нацеленная на оксигенированный и деоксигенированный гемоглобин, спектроскопия в ближней инфракрасной области с непрерывной длиной волны (near-infrared continuous-wave spectroscopy, NIRcws), которая измеряет относительные изменения оксигенации в ткани [53]. Методы NIRS использовались для оценки изменений метаболических характеристик БЖТ человека, включая оксигенированный гемоглобин, деоксигенированный гемоглобин, общий гемоглобин, насыщение гемоглобина кислородом и приведенный коэффициент рассеяния при различных стимуляциях и после термогенной пищевой добавки [54].

М.Г. Kolonin и соавт. (2006) выполнили скрининг с комбинаторной библиотекой пептидов у мышей и охарактеризовали пептид, который может избирательно связываться с сосудистым эндотелием БЖТ [55]. Визуализация *in vivo* с использованием пептидной пробы 3, меченной инфракрасной флуоресцирующей меткой IRDye800 (PEP3-IRDye800), показала накопление в БЖТ, сигнал увеличивался после обработки холодом.

Х. Zhang и соавт. в 2015 г. обнаружили два аналога куркумина (CRANAD-2 и -3), которые имеют относительно

высокое поглощение в БЖТ. После дальнейших структурных модификаций CRANAD-29 был подтвержден за его превосходную способность к визуализации БЖТ. Данные *in vivo* показали, что CRANAD-29 может обнаруживать активацию БЖТ при воздействии холода [56].

Возможности инфракрасной термографии (ИРТ) для оценки термогенеза БЖТ изучаются с 2012 г. Термогенез БЖТ при различных стимуляциях, включая воздействие холода, инъекцию капсиноидов, психологический стресс и пероральный тест на толерантность к глюкозе, контролировали с помощью ИРТ в отдельных исследованиях [36]. Результаты показывают, что ИРТ является многообещающим методом для обнаружения активации БЖТ.

Биолюминесцентная и фотоакустическая визуализация бурой жировой ткани

Х. Zhang и соавт. (2013) сообщили, что люминесцентная визуализация Черенкова с ¹⁸F-FDG может использоваться для мониторинга активации БЖТ в различных условиях [57]. W. Li и соавт. (2020) указали, что гептаметиновый краситель CyHF-8 способен неинвазивно выявлять межлопаточную БЖТ как с помощью NIRS, так и с помощью фотоакустической визуализации (photoacoustic imaging) PAI (рис. 7) [58].

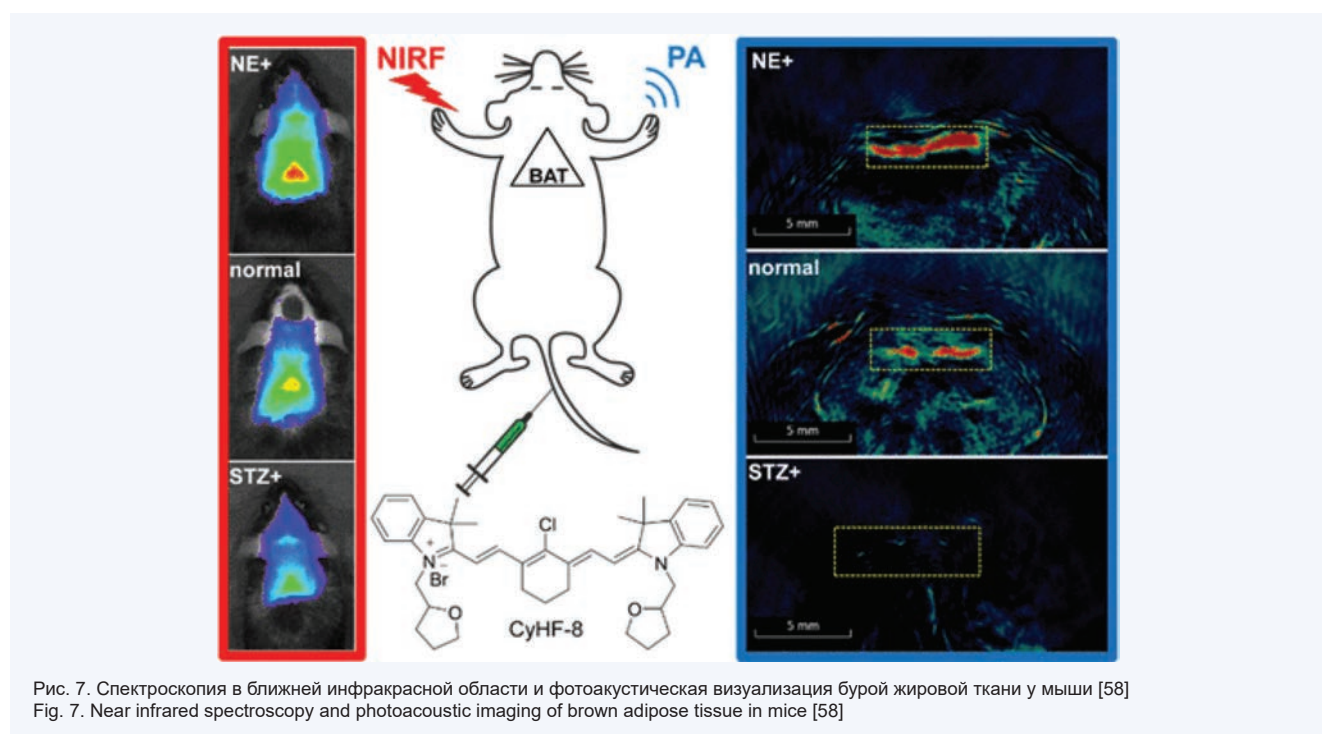


Рис. 7. Спектроскопия в ближней инфракрасной области и фотоакустическая визуализация бурой жировой ткани у мыши [58]
Fig. 7. Near infrared spectroscopy and photoacoustic imaging of brown adipose tissue in mice [58]

А.Н. Henkin и соавт. (2012) сообщили, что зонд для биолюминесцентной визуализации FFA-SS-luc, конъюгат длинноцепочечных жирных кислот и люциферина светлячка, можно использовать для биолюминесцентной визуализации БЖТ и для мониторинга поглощения жирных кислот при активации БЖТ [59].

Ультразвуковое исследование с контрастным усилением (Contrast Enhanced Ultrasound, CEUS)

Ультразвуковое исследование с контрастным усилением (CEUS) является привлекательным подходом для оценки БЖТ из-за его относительно низкой стоимости,

отсутствия воздействия ионизирующего излучения, а также широкой доступности оборудования в клинических условиях. Преимущества делают его потенциальным методом визуализации для лонгитюдных исследований, включающих фармакологические вмешательства или естественное течение болезни.

М. Clerte и соавт. (2013) продемонстрировали применимость CEUS для оценки как массы БЖТ, так и кровотока БЖТ при стимуляции. При активации симпатической нервной системой БЖТ увеличивает расход энергии на выработку тепла. Контрастное УЗИ может оценить кровоток БЖТ и измерить перфузируемый объем органа

и, следовательно, его массу [60]. В данной работе контрастное УЗИ БЖТ (линейный датчик 14 МГц) проводи-

лось до и после стимуляции БЖТ норадреналином (НЭ) (рис. 8).

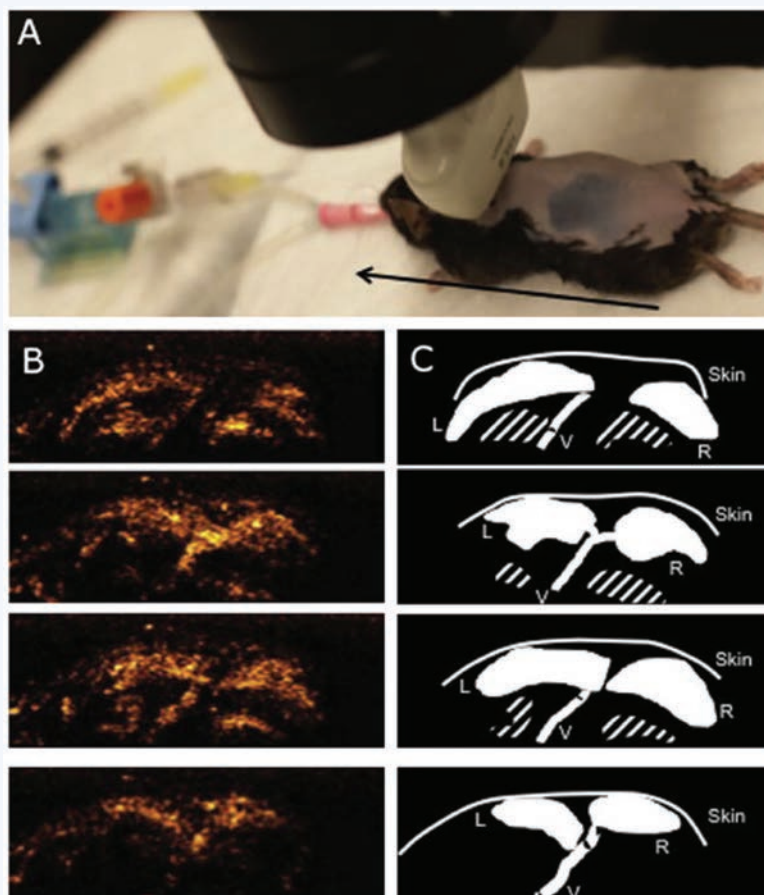


Рис. 8. Визуализация бурой жировой ткани с помощью ультразвукового исследования с контрастным усилением [60]
Fig. 8. Visualization of brown adipose tissue using contrast-enhanced ultrasound [60]

Были получены кривые восполнения БЖТ, кровотока оценивался произведением плато и наклона кривой. Кроме того, после стимуляции НЭ были получены последовательные двумерные изображения перфузируемой БЖТ с интервалом в 1 мм, которые использовались для оценки объема и массы БЖТ. Масса БЖТ, определенная с помощью контрастного ультразвука у мышей, коррелировала с массой БЖТ, полученной при вскрытии ($r_2 = 0,83$; $p < 0,001$).

Заключение

Модификация толщины ЭЖТ путем снижения веса и фармакологической терапии имеет терапевтическое значение при сердечно-сосудистых заболеваниях, сахарном диабете 2-го типа и МС. ЭЖТ представляет собой измеримую, модифицируемую потенциальную терапевтическую мишень, которая коррелирует с висцеральным ожирением.

Литература / References

1. Lavie C.J., Milani R.V., Ventura H.O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;53(21):1925–1932. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.12.068.

Измерение ЭЖТ с помощью трансторакальной ЭхоКГ является экономически эффективным, легкодоступным, точным и воспроизводимым методом, который может учитываться в оценке сердечно-сосудистого риска. Визуализация ЭЖТ однажды может послужить полезным диагностическим инструментом для стратификации риска МС и связанных с ним состояний, включая апноэ во сне, мерцательную аритмию, инсульт, деменцию, различные виды рака; и остеопороз.

БЖТ в висцеральных депо можно обнаружить с помощью различных методов визуализации. Однако отсутствие неинвазивных методов количественного определения массы БЖТ *in vivo* по-прежнему является одним из препятствий в исследованиях. Требуется разработка новых методов визуализации, нацеленных на стабильно экспрессируемые биомаркеры в БЖТ и оптимизацию существующих подходов, для их применения в клинических целях.

2. Iacobellis G., Bianco A.C. Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol. Metab.* 2011;22(11):450–457. DOI: 10.1016/j.tem.2011.07.003.
3. Rabkin S.W. Epicardial fat: Properties, function and relationship to obesity. *Obes. Rev.* 2007;8(3):253–261. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2006.00293.x.

4. Iacobellis G., Corradi D., Sharma A.M. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2005;2:536–543. DOI: 10.1038/npcardio0319.
5. Doukbi E., Soghomonian A., Sengenès C., Ahmed S., Ancel P., Dutour A. et al. Browning epicardial adipose tissue: friend or foe? *Cells.* 2022;11(6):991. DOI: 10.3390/cells11060991.
6. Vural B., Atalar F., Ciftci C., Demirkan A., Susleyici-Duman B., Gunay D. et al. Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. *Cardiovasc. Pathol.* 2008;17(6):392–398. DOI: 10.1016/j.carpath.2008.02.006.
7. Sacks H.S., Fain J.N., Holman B., Cheema P., Chary A., Parks F. et al. Uncoupling protein-1 and related mRNAs in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94:3611–3615. DOI: 10.1210/jc.2009-0571.
8. Sacks H.S., Fain J.N., Bahouth S.W., Ojha S., Frontini A., Budge H. et al. Adult epicardial fat exhibits beige features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(9):E1448–E1455. DOI: 10.1210/jc.2013-1265.
9. Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat. Rev. Cardiol.* 2022;19(9):593–606. DOI: 10.1038/s41569-022-00679-9.
10. Butcovanu D., Mocanu V., Timofte D.V., Costan V.V., Danila R., Veselin A.P. et al. Macrophage accumulation and angiogenesis in epicardial adipose tissue in cardiac patients with or without chronic heart failure. *Appl. Sci.* 2020;10:5871. DOI: 10.3390/app10175871.
11. Gaborit B., Sengenès C., Ancel P., Jacquier A., Dutour A. Role of epicardial adipose tissue in health and disease: a matter of fat? *Compr. Physiol.* 2017;7:1051–1082. DOI: 10.1002/cphy.c160034.
12. Shaihov-Teper O., Ram E., Ballan N., Brzezinski R.Y., Naftali-Shani N., Masoud R. et al. Extracellular vesicles from epicardial fat facilitate atrial fibrillation. *Circulation* 2021;143:2475–2493. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052009.
13. Cherian S., Lопасчук G.D., Carvalho E. Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 2012;303:E937–E949. DOI: 10.1152/ajpendo.00061.2012.
14. Gaborit B., Abdesselam I., Dutour A. Epicardial Fat: More than Just an “Epi” Phenomenon? *Horm. Metab. Res.* 2013;45(13):991–1001. DOI: 10.1055/s-0033-1358669.
15. Flüchter S., Haghi D., Dinter D., Heberlein W., Köhl H.P., Neff W. et al. Volumetric assessment of epicardial adipose tissue with cardiovascular magnetic resonance imaging. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(4):870–878. DOI: 10.1038/oby.2007.591.
16. Granér M., Siren R., Nyman K., Lundbom J., Hakkarainen A., Pentikäinen M.O. et al. Cardiac steatosis associates with visceral obesity in nondiabetic obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(3):1189–1197. DOI: 10.1210/jc.2012-3190.
17. Iacobellis G., Pond C.M., Sharma A.M. Different “weight” of cardiac and general adiposity in predicting left ventricle morphology. *Obesity.* 2006;14(10):1679–1684. DOI: 10.1038/oby.2006.192.
18. Кузнецова Т.Ю., Чумакова Г.А., Дружилов М.А., Веселовская Н.Г. Роль количественной эхокардиографической оценки эпикардальной жировой ткани у пациентов с ожирением в клинической практике. *Российский кардиологический журнал.* 2017;(4):81–87. [Kuznetsova T.Y., Chumakova G.A., Druzilov M.A., Veselovskaya N.G. Clinical application of echocardiographic assessment of epicardial fat tissue in obesity. *Russian Journal of Cardiology.* 2017;(4):81–87. (In Russ.)]. DOI: 10.15829/1560-4071-2017-4-81-87.
19. Chu C.Y., Lee W.H., Hsu P.C., Lee M.K., Lee H.H., Chiu C.A. et al. Association of increased epicardial adipose tissue thickness with adverse cardiovascular outcomes in patients with atrial fibrillation. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(11):E2874. DOI: 10.1097/MD.0000000000002874.
20. Pierdomenico S.D., Pierdomenico A.M., Cuccurullo F., Iacobellis G., Meta-analysis of the relation of echocardiographic epicardial adipose tissue thickness and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* 2013;111:73–78. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.08.044.
21. Villasante Fricke A.C., Iacobellis G. Epicardial adipose tissue: clinical biomarker of cardio-metabolic risk. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(23):5989. DOI: 10.3390/ijms20235989.
22. Crendal E., Duthell F., Naughton G., McDonald T., Obert P. Increased myocardial dysfunction, dyssynchrony, and epicardial fat across the lifespan in healthy males. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2014;14:95. DOI: 10.1186/1471-2261-14-95.
23. Spearman J.V., Renker M., Schoepf U.J., Krazinski A.W., Herbert T.L., De Cecco C.N. et al. Prognostic value of epicardial fat volume measurements by computed tomography: a systematic review of the literature. *Eur. Radiol.* 2015;25(11):3372–81. DOI: 10.1007/s00330-015-3765-5.
24. Oikonomou E.K., Siddique M., Antoniades C. Artificial intelligence in medical imaging: a radiomic guide to precision phenotyping of cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2020;116:2040–2054. DOI: 10.1093/cvr/cvaa021.
25. Попов Е. В., Анашбаев Ж.Ж., Мальцева А. Н., Сазонова С. И. Радиомические характеристики текстурных изменений эпикардальной жировой ткани при атеросклеротическом поражении коронарных артерий. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(4):6–16. [Popov E.V., Anashbaev Z.Z., Maltseva A.N., Sazonova S.I. Radiomic features of epicardial adipose tissue in coronary atherosclerosis. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(4):6–16. (In Russ.)]. DOI: 10.17802/2306–1278-2021-10-4-6-16.
26. Ilyushenkova J., Sazonova S., Popov E., Zavadovsky K., Batalov R., Archakov E. et al. Radiomic phenotype of epicardial adipose tissue in the prognosis of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation in patients with lone atrial fibrillation. *J. Arrhythm.* 2022;38(5):682–693. DOI: 10.1002/joa3.12760.
27. Iacobellis G., Mahabadi A.A. Is epicardial fat attenuation a novel marker of coronary inflammation? *Atherosclerosis.* 2019;284:212–213. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.023.
28. Iacobellis G., Secchi F., Capitanio G., Basilio S., Schiaffino S., Boveri S. et al. Epicardial fat inflammation in severe COVID-19. *Obesity (Silver Spring).* 2020;28(12):2260–2262. DOI: 10.1002/oby.23019.
29. Wang Q., Chi J., Wang C., Yang Y., Tian R., Chen X. Epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease: a meta-analysis. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2022;9(8):253. DOI: 10.3390/jcdd9080253.
30. Mahabadi A.A., Berg M.H., Lehmann N., Kälsch H., Bauer M., Kara K. et al. Association of epicardial fat with cardiovascular risk factors and incident myocardial infarction in the general population: the Heinz Nixdorf Recall Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;61(13):1388–1395. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.11.062.
31. Ding J., Hsu F.C., Harris T.B., Liu Y., Kritchevsky S.B., Szklo M. et al. The association of pericardial fat with incident coronary heart disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am. J. Clin. Nutr.* 2009;90(3):499–504. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27358.
32. Maimaituxun G., Shimabukuro M., Fukuda D., Yagi S., Hirata Y., Iwase T. et al. Local thickness of epicardial adipose tissue surrounding the left anterior descending artery is a simple predictor of coronary artery disease-new prediction model in combination with Framingham risk score. *Circ. J.* 2018;82(5):1369–1378. DOI: 10.1253/circj.CJ-17-1289.
33. Kotanidis C.P., Antoniades C. Perivascular fat imaging by computed tomography (CT): a virtual guide. *Br. J. Pharmacol.* 2021;178:4270–4290. DOI: 10.1111/bph.15634.
34. Oikonomou E.K., Marwan M., Desai M.Y., Mancio J., Alashi A., Hutt Centeno E. et al. Non-invasive detection of coronary inflammation using computed tomography and prediction of residual cardiovascular risk (the CRISP CT Study): a post-hoc analysis of prospective outcome data. *Lancet.* 2018;392(10151):929–939. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31114-0.
35. Gorter P.M., de Vos A.M., van der Graaf Y., Stella P.R., Doevendans P.A., Meijis M.F. et al. Relation of epicardial and pericoronary fat to coronary atherosclerosis and coronary artery calcium in patients undergoing coronary angiography. *Am. J. Cardiol.* 2008;102(4):380–385. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.04.002.
36. Брель Н.К., Груздева О.В., Коков А.Н., Масенко В.Л., Белик Е.В., Дылева Ю.А. и др. Взаимосвязь кальциноза коронарных артерий и локальных жировых депо у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(3):51–63. [Brel N.K., Gruzdeva O.V., Kokov A.N., Masenko V.L., Belik E.V., Dyleva U.A. et al. Relationship of coronary calcinosis and local fat deposits in patients with coronary artery disease. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(3):51–63. (In Russ.)]. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-51-63.
37. Djaberri R., Schuijff J.D., van Werkhoven J.M., Nucifora G., Jukema J.W., Bax J.J. Relation of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 2008;102(12):1602–1607. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.08.010.
38. Blachnio-Zabielska A.U., Baranowski M., Hirnle T., Zabielski P., Lewczuk A., Dmitruk I. et al. Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance. *Lipids.* 2012;47(12):1131–1141. DOI: 10.1007/s11745-012-3722-x.
39. Yang J., Zhang H., Parhat K., Xu H., Li M., Wang X. et al. Molecular imaging of brown adipose tissue mass. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(17):9436. DOI: 10.3390/ijms22179436.
40. Бургий М. Е., Сергиенко И. В., Сергиенко В. Б. Взаимосвязь структуры и секреторной функции жировой ткани с развитием атеросклероза по данным позитронно-эмиссионной томографии. *Обзор литературы. Атеросклероз и дислипидемии.* 2020;4(41):12–19.

- [Bugriy M. E., Sergienko I. V. Sergienko V. B. Relationship between the structure and secretory function of adipose tissue and the development of atherosclerosis according to positron emission tomography. Literature review. *Atherosclerosis and dyslipidemia*. 2020;4(41):12–19. (In Russ.). DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.04.0002.
41. Chen K.Y., Cypess A.M., Laughlin M.R., Haft C.R., Hu H.H., Bredella M.A. et al. Brown adipose reporting criteria in imaging studies (BARCIST 1.0): recommendations for standardized FDG-PET/CT experiments in humans. *Cell Metab*. 2016;24(2):210–222. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.07.014.
 42. Yang J., Zhang H., Parhat K., Xu H., Li M., Wang X. et al. Molecular imaging of brown adipose tissue mass. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(17):9436. DOI: 10.3390/ijms22179436.
 43. Fraum T.J., Crandall J.P., Ludwig D.R., Chen S., Fowler K.J., Laforest R.A. et al. Repeatability of quantitative brown adipose tissue imaging metrics on positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in humans. *Cell Metab*. 2019;30(1):212–224.e4. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.05.019.
 44. Labbé S.M., Caron A., Bakan I., Laplante M., Carpentier A.C., Lecomte R. et al. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB J*. 2015;29:2046–2058. DOI: 10.1096/fj.14-266247.
 45. Richard M.A., Blondin D.P., Noll C., Lebel R., Lepage M., Carpentier A.C. Determination of a pharmacokinetic model for [¹¹C]-acetate in brown adipose tissue. *EJNMMI Res*. 2019;9(1):31. DOI: 10.1186/s13550-019-0497-6.
 46. U Din M., Raiko J., Saari T., Kudomi N., Tolvanen T., Oikonen V. et al. Human brown adipose tissue [(15)O]O₂ PET imaging in the presence and absence of cold stimulus. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2016;43(10):1878–1886. DOI: 10.1007/s00259-016-3364-y.
 47. Madar I., Naor E., Holt D., Ravert H., Dannals R., Wahl R. Brown adipose tissue response dynamics: in vivo insights with the voltage sensor 18F-fluorobenzyl triphenyl phosphonium. *PLoS One*. 2015;10(6):1–13. DOI: 10.1371/journal.pone.0129627.
 48. Yang J., Yang J., Wang L., Moore A., Liang S.H., Ran C. Synthesis-free PET imaging of brown adipose tissue and TSPO via combination of disulfiram and ⁶⁴CuCl₂. *Sci. Rep*. 2017;7(1):8298. DOI: 10.1038/s41598-017-09018-2.
 49. Chen Y.C., Cypess A.M., Chen Y.C., Palmer M., Kolodny G., Kahn C.R. et al. Measurement of human brown adipose tissue volume and activity using anatomic MR imaging and functional MR imaging. *J. Nucl. Med*. 2013;54(9):1584–1587. DOI: 10.2967/jnumed.112.117275.
 50. Yaligar J., Verma S.K., Gopalan V., Anantharaj R., Thu Le G.T., Kaur K. et al. Dynamic contrast-enhanced MRI of brown and beige adipose tissues. *Magn. Reson. Med*. 2020;84(1):384–395. DOI: 10.1002/mrm.28118.
 51. Wu M., Junker D., Branca R.T., Karampinos D.C. Magnetic resonance imaging techniques for brown adipose tissue detection. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020;11:421. DOI: 10.3389/fendo.2020.00421.
 52. Chondronikola M., Beeman S.C., Wahl R.L. Non-invasive methods for the assessment of brown adipose tissue in humans. *J. Physiol*. 2018;596(3):363–378. DOI: 10.1113/JP274255.
 53. Hamaoka T., Nirengi S., Fuse S., Amagasa S., Kime R., Kuroiwa M. et al. Near-infrared time-resolved spectroscopy for assessing brown adipose tissue density in humans: a review. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020;11:261. DOI: 10.3389/fendo.2020.00261.
 54. Fuse S., Nirengi S., Amagasa S., Homma T., Kime R., Endo T. et al. Brown adipose tissue density measured by near-infrared time-resolved spectroscopy in Japanese, across a wide age range. *J. Biomed. Opt*. 2018;23(6):1–9. DOI: 10.1117/1.JBO.23.6.065002.
 55. Kolonin M.G., Sun J., Do K.A., Vidal C.I., Ji Y., Baggerly K.A. et al. Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by in vivo phage display. *FASEB J*. 2006;20(7):979–981. DOI: 10.1096/fj.05-5186fje.
 56. Zhang X., Tian Y., Zhang H., Kavishwar A., Lynes M., Brownell A.-L. et al. Curcumin analogues as selective fluorescence imaging probes for brown adipose tissue and monitoring browning. *Sci. Rep*. 2015;5:13116. DOI: 10.1038/srep13116.
 57. Zhang X., Kuo C., Moore A., Ran C. In vivo optical imaging of interscapular brown adipose tissue with 18F-FDG via Cerenkov luminescence imaging. *PLoS One*. 2013;8(4):e62007. DOI: 10.1371/journal.pone.0062007.
 58. Li W., Ma J., Jiang Q., Zhang T., Qi Q., Cheng Y. Fast noninvasive measurement of brown adipose tissue in living mice by near-infrared fluorescence and photoacoustic imaging. *Anal. Chem*. 2020;92(5):3787–3794. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05162.
 59. Henkin A.H., Cohen A.S., Dubikovskaya E.A., Park H.M., Nikitin G.F., Auzias M.G. et al. Real-time noninvasive imaging of fatty acid uptake in vivo. *ACS Chem. Biol*. 2012;7(11):1884–1891. DOI: 10.1021/cb300194b.
 60. Clerte M., Baron D.M., Brouckaert P., Ernande L., Raheer M.J., Flynn A.W. et al. Brown adipose tissue blood flow and mass in obesity: a contrast ultrasound study in mice. *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2013;26(12):1465–1473. DOI: 10.1016/j.echo.2013.07.015.

Информация о вкладе авторов

Василькова Т.Н. внесла существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, вносила правки с целью повышения научной ценности статьи, участвовала в написании окончательной версии, отредактировала и одобрила ее.

Мищенко Т.А. внесла существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, сгруппировала имеющиеся мировые и отечественные данные, осуществляла общую компоновку и контроль, участвовала в написании окончательной версии, отредактировала и одобрила ее.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Сведения об авторах

Василькова Татьяна Николаевна, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии, Тюменский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-4753-6630.

E-mail: vasilkovata@rambler.ru.

Мищенко Татьяна Андреевна, канд. мед. наук, доцент кафедры факультетской терапии, Тюменский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-5464-9903.

E-mail: neotanya@mail.ru.

 **Мищенко Татьяна Андреевна**, e-mail: neotanya@mail.ru.

Information on author contributions

Vasilkova T.N. made a significant contribution to the concept and design of the study, made edits to increase the scientific value of the article, participated in writing and revising the final version, and approved the manuscript for publication.

Mischenko T.A. made a significant contribution to the concept and design of the study, grouped available international and national data, carried out the overall layout, provided general supervision, participated in writing and revising the final version, and approved the manuscript for publication.

All authors approved the final version of the article before publication, agreed to be responsible for all aspects of the work, implying proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

Information about the authors

Tatyana N. Vasilkova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Faculty Therapy Department, Tyumen State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-4753-6630.

E-mail: vasilkovata@rambler.ru.

Tatyana A. Mischenko, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Faculty Therapy Department, Tyumen State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-5464-9903.

E-mail: neotanya@mail.ru.

 **Tatyana A. Mischenko**, e-mail: neotanya@mail.ru.

Received December 13, 2022

Поступила 13.12.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-58-63>
УДК 616.12-005.4:616.155.2-005.6:546.221.1:57.053.4

Роль донора сероводорода в аденозиндифосфат-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца

И.В. Петрова¹, О.А. Трубачева^{1,2}, Ю.Г. Бирулина¹,
С.П. Чумакова¹, С.В. Гусакова¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Введение. Активация тромбоцитов – начальный этап тромботических осложнений при патологических состояниях, в первую очередь при атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ). Эндогенный сероводород (H_2S) является антиагрегантом, но конкретные пути реализации его эффектов не вполне раскрыты.

Цель исследования: изучить влияние H_2S на аденозиндифосфат (АДФ)-индуцированную агрегацию тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) в присутствии блокаторов $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера (НКСС), анионного обменника и ингибитора фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Материал и методы. В исследование были включены 22 пациента с ИБС, контрольную группу составили 14 здоровых добровольцев. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом. Определяли степень агрегации (%) и размер агрегатов (отн. ед.). Индуктором агрегации служил АДФ (2 мкМ). В ряде случаев среда инкубации содержала донор сероводорода $NaHS$ (1–100 мкМ) и модификаторы агрегации.

Результаты. Донор H_2S в концентрации 100 мкМ снижал показатели АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев, а у больных с ИБС, напротив, их увеличивал. Блокаторы НКСС и анионного обменника, а также ингибитор ФДЭ снижали АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов у здоровых добровольцев. Совместное действие перечисленных агентов и $NaHS$ усиливало подавляющие эффекты примененных модификаторов. Результаты, полученные для агрегации тромбоцитов у пациентов с ИБС, отличались разнонаправленностью.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что антиагрегационный эффект H_2S реализуется через воздействие на $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортер и анионный обменник, а также за счет влияния на звенья сигнальной системы, опосредованной циклическими нуклеотидами.

Ключевые слова:	сероводород, агрегация, тромбоциты, ишемическая болезнь сердца, $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортер, анионный обменник, циклические нуклеотиды.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-3302.2022.1.4).
Соответствие принципам этики:	исследования одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 9106 от 30.05.2022 г.).
Для цитирования:	Петрова И.В., Трубачева О.А., Бирулина Ю.Г., Чумакова С.П., Гусакова С.В. Роль донора сероводорода в аденозиндифосфат-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):58–63. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-58-63 .

The role of the hydrogen sulfide donor in adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in patients with coronary heart disease

Irina V. Petrova¹, Oksana A. Trubacheva^{1,2}, Julia G. Birulina¹,
Svetlana P. Chumakova¹, Svetlana V. Gusakova¹

¹ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Abstract

Introduction. Platelet activation is the initial stage of thrombotic complications in pathological conditions, primarily in atherosclerotic cardiovascular diseases. Endogenous hydrogen sulfide (H₂S) is an antiplatelet agent, but the specific ways to realize its effects are not studied enough

Aim: To study the effect of H₂S on adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation in patients with coronary heart disease (CHD) with blockers of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC), an anion exchanger, and a phosphodiesterase (PDE) inhibitor of cyclic nucleotides.

Material and Methods. The study included 22 patients with CHD. The control group included 14 healthy volunteers. Platelet aggregation was determined by turbidimetric method. The degree of aggregation (%) and the size of aggregates (rel. units) were measured. ADP (2 μM) was an aggregation inductor. In some cases the incubation medium contained the hydrogen sulfide donor NaHS (1–100 μM) and aggregation modifier

Results. The H₂S donor at a concentration of 100 μM reduced the parameters of ADP-dependent platelet aggregation in healthy volunteers and increased it in patients with coronary artery disease. NKCC and anion exchanger blockers, as well as a PDE inhibitor, reduced ADP-dependent platelet aggregation in healthy volunteers. The combined action of these agents and NaHS enhanced the inhibitory effects of the applied modifiers. The results obtained for platelet aggregation in patients with coronary artery disease differed in different direction

Conclusion. The obtained data indicate that the antiaggregation effect of H₂S is realized through the effect on the NKCC and anion exchanger, as well as due to the effect on the links of the signaling system mediated by cyclic nucleotides.

Keywords:	hydrogen sulfid , aggregation, platelet, coronary heart disease, Na ⁺ ,K ⁺ ,2Cl ⁻ -cotransporter, anion exchanger, cyclic nucleotides.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	the study was funded by Council for Grants of the President of the Russian Federation (CS-3302.2022.1.4).
Adherence to ethical standards:	the studies were approved by the ethics committee of the Siberian State Medical University (protocol No. 9106, 30.05.2022).
For citation:	Petrova I.V., Trubacheva O.A., Birulina J.G., Chumakova S.P., Gusakova S.V. The role of the hydrogen sulfid donor in adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in patients with coronary heart disease. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):58–63. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-58-63 .

Введение

В настоящее время проблема смертности и инвалидизации населения вследствие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) остается такой же животрепещущей, что и десятилетия назад. Несмотря на успехи в определении патогенетических механизмов и разработку новых методов лечения и профилактики ССЗ, в том числе и ишемической болезни сердца (ИБС), она сохраняет одну из лидирующих позиций в структуре смертности населения. Так, в 2016 г. смертность от ССЗ составила 47,8% [1]. Факторы, которые провоцируют

развитие ИБС, приводят к усилению функциональной активности тромбоцитов и их способности к агрегации [2]. В свою очередь ингибиторы агрегации тромбоцитов, которые используются в качестве средств профилактики тромбоза, нередко вызывают осложнения в связи с повышенным риском кровотечений.

Исходя из вышесказанного, актуальными являются выяснение вклада тромбоцитов в прогрессирование сердечно-сосудистой патологии и разработка оптимальных подходов к коррекции возникающих нарушений. Перспективным направлением в этом отношении представляется раскрытие механизмов антиагрегационной активности

сероводорода (H_2S) как эндогенного регулятора широкого спектра физиологических функций [3]. Имеются сведения, что H_2S препятствует агрегации тромбоцитов [4, 5], но посредством каких именно внутриклеточных сигнальных путей осуществляется его действие, точно не установлено. Еще менее известно, какие эффекты проявляет газовый трансмиттер при патологических состояниях, в частности при сердечно-сосудистой патологии.

Тромбоциты обладают богатым набором рецепторов к различным биологически активным веществам, которые опосредуют их агрегацию. Выявление регуляторных механизмов, связанных с H_2S и опосредующих изменение функциональной активности тромбоцитов в нормальных и патологических условиях, позволит приблизиться к пониманию кооперативных взаимодействий внутриклеточных сигнальных путей.

Цель исследования: изучение влияния H_2S на аденозиндифосфат (АДФ)-индуцированную агрегацию тромбоцитов у пациентов с ИБС в присутствии блокаторов $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера (НКСС), анионного обменника и ингибитора фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Материал и методы

Проведено одномоментное поперечное сравнительное исследование (36 человек). В контрольную группу вошли 14 здоровых добровольцев в возрасте от 45 до 60 лет (11 женщин и 2 мужчин), не страдающих сахарным диабетом, ожирением, с нормальным артериальным давлением, без сосудистых и эндокринных заболеваний в анамнезе. Группа пациентов с ИБС включала 22 человека в возрасте от 41 до 75 лет (12 женщин и 10 мужчин). Все обследованные лица подписали информированное согласие. Работа была одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение № 9106 от 30.05.2022 г.). Клинический диагноз верифицировали с помощью клинико-лабораторных методов исследования на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Все обследованные пациенты получали регулярную комбинированную антигипертензивную и противовоспалительную терапию.

Критериями невключения в исследование являлись острые сосудистые осложнения давностью менее 6 мес., тяжелая сопутствующая патология, клинические и лабораторные признаки острого воспаления, отказ от участия в исследовании, а для добровольцев группы контроля – наличие хронических заболеваний сердца и сосудов.

У всех обследованных лиц венозную кровь забирали утром натощак из локтевой вены в вакутейнеры, содержащие цитрат натрия (3,8%). Кровь тщательно перемешивали с антикоагулянтом, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 мин. Отбирали надосадочную жидкость – богатую тромбоцитами плазму. Агрегационную активность тромбоцитов изучали турбидиметрическим методом на лазерном анализаторе (220 LA «НПФ Биола», Россия). Для стимуляции агрегации использовали АДФ (2 мкМ). По кривой светопропускания определяли степень агрегации тромбоцитов (%), по кривой среднего размера агрегата – размер агрегата (отн. ед.). Гидросульфид натрия ($NaHS$, в концентрациях от 1 до 100 мкМ) выступал в роли донора H_2S . Изучали влияние $NaHS$ на агрегацию тромбоцитов при ингибировании анионного обменника (SITS, 100 мкМ), НКСС (буметанид, 5 мкМ), ФДЭ циклических нуклеотидов (IBMХ, 100 мкМ). Тромбоциты инкубировали с данными модификаторами в течение 30 мин при 37 °С до внесения АДФ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 13.0 (StatSoft, Inc.). Для оценки нормальности распределения количественных признаков использовали критерий Шапиро – Уилка. Анализ различий между выборками выполняли с помощью непараметрического Т-критерия Вилкоксона (для зависимых выборок) или U-критерия Манна – Уитни (для независимых выборок). Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_1 ; Q_3). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

В работах, связанных с изучением роли H_2S в различных клетках, традиционно используется донор H_2S – гидросульфид натрия $NaHS$ [6]. Концентрация H_2S в плазме крови человека составляет в физиологических условиях от 10 до 100 мкМ [7]. В связи с этим в исследовании применяли концентрации $NaHS$ от 1 мкМ до 100 мкМ.

Следует отметить, что исследованные параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов статистически значимо отличались в группе здоровых добровольцев и больных ИБС (табл. 1). Так, степень агрегации и размер агрегата оказались достоверно ниже у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми добровольцами. Причиной обнаруженных различий, вероятно, является применение большими антиагрегантных препаратов.

Таблица 1. Параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии $NaHS$ у здоровых добровольцев и пациентов с ишемической болезнью сердца, Me (Q_1 ; Q_3)

Table 1. Parameters of ADP-induced platelet aggregation in the presence of $NaHS$ in healthy volunteers and patients with coronary heart disease, Me (Q_1 ; Q_3)

Группы Groups	Параметры агрегации тромбоцитов Parameters of platelet aggregation	+ АДФ (2 мкМ) + ADP (2 μ M)	Концентрация $NaHS$ NaHS concentration		
			1 мкМ 1 μ M	10 мкМ 10 μ M	100 мкМ 100 μ M
Здоровые добровольцы (n = 14) Healthy volunteers (n = 14)	Степень агрегации, % Degree of aggregation, %	15,55 (4,15; 41,38)	11,72 (7,41; 18,37)	4,49 (2,58; 6,43)	6,09 (2,29; 11,44) #
	Размер агрегатов, отн. ед. Size of aggregates, rel. units	13,49 (6,29; 18,58)	6,83 (3,09; 12,42)	3,11 (2,11; 11,68)	3,08 (2,23; 10,33) #
Пациенты с ИБС (n = 22) Patients with coronary heart disease (n = 22)	Степень агрегации, % Degree of aggregation, %	0,86 (0,43; 2,37) *	1,8 (1,06; 3,68) *	1,18 (0,95; 1,97) *	2,1 (1,18; 3,24) *#
	Размер агрегатов, отн. ед. Size of aggregates, rel. units	1,51 (1,36; 1,79) *	2,05 (1,36; 2,36) *	1,42 (1,37; 1,94) *	1,96 (1,83; 5,38) *

Примечание: АДФ – аденозиндифосфат, ИБС – ишемическая болезнь сердца, * – $p < 0,05$ различия по сравнению со здоровыми добровольцами, # – $p < 0,05$ различия по сравнению с АДФ без добавления $NaHS$.

Note: ADP - adenosine diphosphate, * – $p < 0.05$ significance vs. healthy volunteers, # – $p < 0.05$ significance vs. ADP without $NaHS$.

Увеличение концентрации NaHS в среде инкубации тромбоцитов здоровых добровольцев приводило к закономерному снижению показателей АДФ-индуцированной агрегации. Однако статистически значимо степень агрегации снижалась в присутствии 100 мкМ NaHS, что подтверждает антиагрегационный эффект H₂S, отмеченный в ряде работ, в том числе и в нашем ранее проведенном исследовании [8, 9]. Не такими однозначными оказались результаты, характеризующие АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов у пациентов с ИБС. Донор H₂S в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ не вызывал значимых изменений степени агрегации и размера агрегатов, тогда как в концентрации 100 мкМ, наоборот, он увеличивал показатели агрегации у пациентов с ИБС (см. табл. 1).

Для выявления мишеней H₂S проведено исследование параметров агрегации тромбоцитов в присутствии блокатора НКСС буметанида (5 мкМ), блокатора анионного обменника (SITS, 100 мкМ) и ингибитора ФДЭ циклических нуклеотидов IBMX (100 мкМ) при действии 100 мкМ NaHS.

Блокирование НКСС буметанидом снижало оба исследованных параметра АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев. Совместное действие буметанида и NaHS приводило к еще большему угнетению агрегации тромбоцитов у этой группы обследованных лиц. Аналогичные результаты получены и при блокировании анионного обменника посредством SITS для группы здоровых добровольцев (табл. 2): SITS снижал степень агрегации и размер агрегатов. Ингибитор

ФДЭ циклических нуклеотидов IBMX также снижал параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев. В присутствии NaHS эффект был еще более выражен.

Таким образом, характеристики АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, полученные для здоровых добровольцев, уменьшались в присутствии использованных модификаторов, а NaHS усугублял их действие.

Результаты, полученные для агрегации тромбоцитов у пациентов с ИБС, отличались разнонаправленностью. Следует отметить, что если у здоровых добровольцев под действием модификаторов агрегации оба параметра изменялись однонаправленно, то у пациентов с ИБС такая закономерность отсутствовала.

Так, в присутствии буметанида у пациентов с ИБС не изменялась степень агрегации, но увеличивался размер агрегатов, а при совместном действии буметанида и NaHS увеличивалась только степень агрегации тромбоцитов по сравнению с параметром, полученным в отсутствии блокатора НКСС и NaHS. При блокировании анионного обменника исследуемые параметры достоверно не изменялись, совместное действие SITS и NaHS также не привело к статистически значимым изменениям параметров агрегации. Степень АДФ-индуцированной агрегации в присутствии IBMX увеличивалась, тогда как размер агрегатов снижался. Совместное действие ингибитора ФДЭ циклических нуклеотидов и NaHS приводило к увеличению размера агрегата, но снижению степени агрегации (табл. 2).

Таблица 2. Параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев и пациентов с ишемической болезнью сердца в присутствии донора сероводорода NaHS и блокаторов, Me (Q₁; Q₃)

Table 2. Parameters of ADP-induced platelet aggregation in healthy volunteers and patients with ischemic heart disease in the presence of hydrogen sulfide donor NaHS and blockers, Me (Q₁; Q₃)

Модификаторы агрегации Aggregation modifier	+ С NaHS, -Без NaHS + With NaHS, -Without NaHS	Здоровые добровольцы (n = 14) Healthy volunteers (n = 14)		Пациенты с ИБС (n = 22) Patients with coronary heart disease (n = 22)	
		Степень агрегации, % Degree of aggregation, %	Размер агрегатов, отн. ед. Size of aggregates, rel. units	Степень агрегации, % Degree of aggregation, %	Размер агрегатов, отн. ед. Size of aggregates, rel. units
АДФ (2 мкМ) ADP (2 μM)	-	15,55 (4,15; 41,38)	13,49 (6,29; 18,58)	0,86 (0,43; 2,37) *	1,51 (1,36; 1,79) *
	+	6,09 (2,29; 11,44) #	3,08 (2,23; 10,33) #	2,1 (1,18; 3,24) *#	1,96 (1,83; 5,38) *
АДФ + Буметанид (5 мкМ) ADP + Bumetanide (5 μM)	-	0,79 (0,36; 1,26) #	1,37 (1,29; 1,49) #	1,49 (1,01; 1,97) *	1,87 (1,74; 2,16) *#
	+	0,56 (0,28; 0,78) &	1,68 (1,66; 2,02) &	2,32 (0,99; 2,97) *	1,94 (1,91; 2,25)
АДФ + SITS (100 мкМ) ADP + SITS (100 μM)	-	1,22 (0,81; 2,22) #	2,18 (1,32; 2,58) #	1,08 (0,54; 2,76)	1,34 (1,25; 1,52) *
	+	0,83 (0,26; 1,02) &	1,65 (1,58; 1,99) &	1,74 (1,06; 2,20) *&	1,68 (1,63; 1,75) &
АДФ + IBMX (100 мкМ) ADP + IBMX (100 μM)	-	1,12 (0,88; 1,23) #	1,64 (1,49; 1,94) #	2,26 (1,99; 3,54) *#	1,29 (1,22; 1,32) *
	+	0,39 (0,34; 0,51) &	1,75 (1,56; 2,09) &	0,36 (0,32; 1,73) &	1,6 (1,36; 1,96) &

Примечание: АДФ – аденозиндифосфат, * – p < 0,05 различия по сравнению со здоровыми добровольцами, # – p < 0,05 различия по сравнению с АДФ без NaHS, & – p < 0,05 различия по сравнению с АДФ с NaHS.

Note: ADP - adenosine diphosphate, * – p < 0.05 significance vs. healthy volunteers, # – p < 0.05 – significance vs. ADP without NaHS, & – p < 0.05 significance vs. ADP with NaHS.

Обсуждение

Агрегацию тромбоцитов вызывают многочисленные биологически активные вещества (индукторы), к которым на мембране кровяных пластинок имеются рецепторы. Активация различных рецепторов запускает каскады вну-

триклеточной сигнализации, что в конечном итоге приводит к агрегации клеток. В настоящем исследовании в качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ, который реализуют свое действие через пуринергические рецепторы. Мембрана тромбоцитов содержит пуринорецепторы типа P2Y1 и P2Y12, которые являются

G-белок-связывающими рецепторами. Активация рецептора P2Y1 приводит к стимуляции фосфолипазы C через Gr(q)-белок. Рецептор P2Y12 реализует свое действие через ингибирующий G_i-белок, который подавляет аденилатциклазу [10, 11].

Эндогенный H₂S участвует в широком спектре процессов в тканях человека и млекопитающих, включая воспаление, сосудистый тонус, гипертонию, целостность слизистой оболочки желудка, нейромодуляцию и защитные механизмы против вирусных инфекций, а также обладает антиагрегационным действием. Приведенные данные, по мнению авторов [12], свидетельствуют о том, что H₂S имеет потенциальную терапевтическую ценность. H₂S является восстановителем из-за степени окисления атома серы в H₂S, которая равна –2. Кроме того, H₂S проявляет свойства нуклеофила при физиологических значениях pH. Эти свойства делают H₂S весьма реакционноспособной кислотой, которая может вступать в реакцию со многими биологическими молекулами [12].

Снижение параметров АДФ-индуцированной агрегации, обнаруженное у здоровых добровольцев в присутствии донора H₂S, возможно, обусловлено S-сульфгидратацией белков, участвующих в агрегации. Этот эффект связан с тем, что эндогенный H₂S модифицирует остатки цистеина во многих белках, превращая SH-группы в -SSH-группы, что изменяет свойства белков [12, 13]. Относительно недавно было обнаружено, что в тромбоцитах присутствуют коннексиновые гемиканалы и щелевые соединения, которые способствуют ранней фазе активации тромбоцитов. Согласно предположению авторов [14], H₂S может ингибировать агрегацию тромбоцитов через каналы щелевого соединения. В тромбоцитах здоровых добровольцев, вероятно, реализуются перечисленные выше механизмы снижения агрегации тромбоцитов под действием сероводорода.

Обнаруженное увеличение агрегационной активности тромбоцитов у больных ИБС в присутствии NaHS, скорее всего, связано с нарушениями, которые отмечаются при этой патологии: увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, окислительное повреждение ключевых белков, участвующих в агрегации, гипергомоцистемия [15]. Согласно данным, приведенным в работах [16, 17], H₂S увеличивает агрегационную способность тромбоцитов при гипергомоцистемии.

В качестве ионных систем, ответственных за гомеостаз Cl⁻ рассматривают НКСС и анионный обменник. В условиях блокирования этих ион-транспортных систем буметанидом и SITS, соответственно, у здоровых добро-

вольцев отмечалось снижение параметров АДФ-стимулированной агрегации. Присутствие H₂S усиливало этот эффект в группе здоровых добровольцев. Вероятной причиной обнаруженного эффекта является снижение внутриклеточной концентрации ионов хлора вследствие блокации НКСС и анионного обменника [9, 17].

Что касается АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов у больных ИБС, то, как было показано выше, обнаружено разнонаправленное действие буметанида и SITS на параметры агрегации, в том числе и в присутствии NaHS. В настоящее время эти факты не нашли оптимального объяснения и требуют дальнейшего исследования.

Поскольку, как уже было отмечено, пуриновые рецепторы реализуют свое действие через модуляцию активности аденилатциклазы, было исследовано влияние ингибитора ФДЭ циклических нуклеотидов IBMX на агрегацию тромбоцитов. Ингибирование ФДЭ приводило к увеличению внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов, проявляющих антиагрегационный эффект [18]. IBMX снижал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов у здоровых добровольцев, причем NaHS усиливал этот эффект. В случае АДФ-индуцированной агрегации у больных ИБС результаты оказались не столь однозначными. IBMX увеличивал степень агрегации тромбоцитов, а совместное действие ингибитора и донора H₂S, напротив, подавляло агрегацию кровяных пластинок. Неоднозначность результатов, полученных для пациентов с ИБС, скорее всего, объясняется изменениями, которые претерпевают белки сигнальных систем при развитии данной сердечно-сосудистой патологии.

Следует учитывать повышенную агрегационную активность тромбоцитов у пациентов с ИБС в присутствии донора H₂S при назначении бальнеотерапии сероводородной водой. В качестве рекомендаций следует отметить, что необходимо определять параметры агрегации тромбоцитов прежде, чем рекомендовать подобные лечебные мероприятия.

Заключение

Таким образом, антиагрегационный эффект H₂S реализуется через воздействие на ион-транспортные системы тромбоцитов, участвующие в поддержании гомеостаза ионов хлора (НКСС и анионный обменник), а также благодаря влиянию на звенья сигнальной системы, опосредованной циклическими нуклеотидами. Нарушения агрегации тромбоцитов, выявленные у пациентов с ИБС, вносят определенные коррективы в реализацию антиагрегационного эффекта H₂S.

Литература / References

1. Бойцов С.А., Шальнова С.А., Деев А.Д. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации и возможные механизмы ее изменения. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018;118(8):98–103. [Boitsov S.A., Shalnova S.A., Deev A.D. Cardiovascular mortality in the Russian Federation and possible mechanisms for its change. *Journal of Neurology and Psychiatry*. C.C. Korsakov. 2018;118(8):98–103. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/jnevro201811808198.
2. Барбараш О.Л., Комаров А.Л., Панченко Е.П., Староверов И.И., Шахнович Р.М., Явелов И.С. Евразийские клинические рекомендации по диагностике и лечению острого коронарного синдрома без подъема сегмента ST. Евразийский кардиологический журнал. 2021;(4):6–59. [Barbarash O.L., Komarov A.L., Panchenko E.P., Staroverov I.I., Shakhnovich R.M., Yavelov I.S. Eurasian clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute coronary syndrome without ST segment elevation. *Eurasian Journal of Cardiology*. 2021;(4):6–59. (In Russ.)]. DOI: 10.38109/2225-1685-2021-4-6-59.
3. Cirino G., Szabo C., Papapetropoulos A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol. Rev*. 2021;103(1):231–276. DOI: 10.1152/physrev.00028.2021.
4. Truss N.J.; Warner T.D. Gasotransmitters and platelets. *Pharmacol. Ther.* 2011;132(2):196–203. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.07.001.
5. Zagli G., Patacchini R., Trevisani M., Abbate R., Cinotti S., Gensini G. F. et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;559(1):65–68. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.12.011.
6. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 1996;16(3):1066–1071. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996.
7. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008;295(4):849–868. DOI: 10.1152 / ajpcell.00283.2008.
8. Петрова И.В., Трубочева О.А., Мангатаева О.С., Суслова Т.Е., Ковалев И.В., Гусакова С.В. Влияние сероводорода на коллаген-

- индуцированную агрегацию тромбоцитов человека. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015;101(10):1191–1201. [Petrova I.V., Trubacheva O.A., Mangataeva O.S., Suslova T.E., Kovalev I.V., Gusakova S.V. Effect of hydrogen sulfide on collagen-induced aggregation of human platelets. *Russian Physiological Journal. I.M. Sechenov*. 2015;101(10):1191–1201. (In Russ.)].
9. Zhong L., Yang J., Liao X., Yu J., Wang R., Zhou P. The inhibitory effect of hydrogen sulfide on platelet aggregation and underlying mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2014;64(5):481–487. DOI: 10.1097/FJC.000000000000142.
 10. Бакунович А.В., Буланова К.Я., Лобанок Л.М. Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов. *Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология*. 2017;4:40–51. [Bakunovich A.V., Bulanova K.Y., Lobanok L.M. Molecular mechanisms of platelet aggregation. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2017;4:40–51. (In Russ.)].
 11. Golaszewska A., Misztal T., Marcinczyk N., Chabielska E., Rusak T. Adrenaline May Contribute to Prothrombotic Condition via Augmentation of Platelet Procoagulant Response, Enhancement of Fibrin Formation, and Attenuation of Fibrinolysis. *Front. Physiol.* 2021;12:657881. DOI: 10.3389/fphys.2021.657881.
 12. Magli E., Perissutti E., Santagada V., Caliendo G., Corvino A., Esposito G. et al. H₂S Donors and Their Use in Medicinal Chemistry. *Biomolecules*. 2021;11:1899–1955. DOI: 10.3390/biom11121899.
 13. Mustafa A., Gadalla M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S. H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Science Signal*. 2009;2(96):72–75. DOI: 10.1126/scisignal.2000464.
 14. Gao L., Cheng C., Paratore A., Zhang H., Wang C. Hydrogen Sulfide Inhibits Human Platelet Aggregation In Vitro in Part by Interfering Gap Junction Channels: Effects of ACS14, a Hydrogen Sulfide-releasing Aspirin. *Heart Lung. Circ.* 2015;24(1):77–85. DOI: 10.1016/j.hlc.2014.05.019.
 15. Das D., Das T., Pramanik S. Hyperhomocysteinemia presenting as exclusive small vessel coronary artery disease (CAD) in a young. *Journal of Family Medicine and Primary Health*. 2022;11(6):3298–3301. DOI: 10.4103/jfmpc.jfmpc_1539_21.
 16. d'Emmanuele di Villa Bianca R., Mitidieri E., Di Minno M.N., Kirkby N.S., Warner T.D., Di Minno G. et al. Hydrogen sulfide pathway contributes to the enhanced human platelet aggregation in hyperhomocysteinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(39):15812–15817. DOI: 10.1073/pnas.1309049110.
 17. Vaitkevicius H., Turner I., Spalding A., Lockette W. Chloride increases adrenergic receptor-mediated platelet and vascular responses. *Am. J. Hypertens.* 2002;15(6):492–498. DOI: 10.1016/s0895-7061(02)02276-8.
 18. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(2):167–176. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04576.x.

Информация о вкладе авторов

Петрова И.В., Чумакова С.П. предложили концепцию исследования, разработали его дизайн.

Трубачева О.А. организовала сбор данных, провела измерения агрегационной активности тромбоцитов.

Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В. участвовали в анализе и обсуждении результатов.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ругаясь за их точность и безупречность.

Сведения об авторах

Петрова Ирина Викторовна, д-р биол. наук, профессор, кафедра биофизики и функциональной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9034-4226.

E-mail: ivpetrova57@yandex.ru.

Трубачева Оксана Александровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра физической культуры и здоровья, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации; научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-1253-3352.

E-mail: otrubacheva@inbox.ru.

Бирулина Юлия Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-1237-9786.

E-mail: birulina20@yandex.ru.

Чумакова Светлана Петровна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3468-6154.

E-mail: kaf.pat.fiziolog@ssmu.r.

Гусакова Светлана Валерьевна, д-р мед. наук, заведующий кафедрой биофизики и функциональной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-5047-8668.

E-mail: gusacova@yandex.ru.

 **Петрова Ирина Викторовна**, e-mail: ivpetrova57@yandex.ru.

Information on author contributions

Petrova I.V., Chumakova S.P. – research concept and design development.

Trubacheva O.A. – experimental part, study of platelet aggregation activity.

Birulina J.G., Gusakova S.V. – data interpretation and analysis.

All authors gave their final consent to submit the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of the work.

Information about the authors

Irina V. Petrova, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Division, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-9034-4226.

E-mail: ivpetrova57@yandex.ru.

Oksana A. Trubacheva, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Physical Education and Health Division, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Research Scientist, Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-1253-3352.

E-mail: otrubacheva@inbox.ru.

Julia G. Birulina, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Division, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-1237-9786.

E-mail: birulina20@yandex.ru.

Svetlana P. Chumakova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Pathophysiology Division, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-3468-6154.

E-mail: kaf.pat.fiziolog@ssmu.ru.

Svetlana V. Gusakova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Biophysics and Functional Diagnostics Division, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-5047-8668.

E-mail: gusacova@yandex.ru.

 **Irina V. Petrova**, e-mail: ivpetrova57@yandex.ru.

Received December 27, 2022

Поступила 27.12.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-64-74>
УДК 616.11/.127-018.26-003.826-06:576.34

Взаимосвязь гипертрофии эпикардальных адипоцитов с адипокинами, воспалением и метаболизмом глюкозы и липидов

О.А. Кошельская¹, Н.В. Нарыжная¹, И.В. Кологривова¹, Т.Е. Сулова¹,
Е.С. Кравченко¹, О.А. Харитонов¹, С.Л. Андреев¹, Н.Ю. Марголис¹,
Н.Г. Шарыпова¹, А.С. Крапивина²

¹ Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

² Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

Аннотация

Изменение структурно-функциональных характеристик эпикардальной жировой ткани (ЭЖТ) является важным фактором развития кардиометаболических нарушений, однако в литературе отсутствуют данные о факторах, определяющих выраженную степень гипертрофии адипоцита ЭЖТ у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Цель исследования: сопоставить размер адипоцита ЭЖТ и долю гипертрофированных адипоцитов с показателями метаболизма глюкозы/инсулина, липидтранспортной функции крови, адипокинового профиля и содержанием в сыворотке крови высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ) у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС), подвергнутых операции аортокоронарного шунтирования (АКШ); установить статистически значимые детерминанты выраженной степени гипертрофии адипоцитов ЭЖТ.

Материал и методы. В исследование включены 42 пациента (м/ж 28/14) в возрасте 53–72 года с ИБС, подвергнутых операции аортокоронарного шунтирования. Материалом для исследования явились адипоциты ЭЖТ, полученные энзиматическим методом из интраоперационных эксплантов. Определяли базальные уровни гликемии, инсулинемии, С-пептида, показатели липидтранспортной функции крови, содержание адипокинов и вчСРБ в сыворотке крови. Медианы показателей размера адипоцитов ЭЖТ и доли адипоцитов ЭЖТ более 100 мкм составили 87,32 мкм и 14,64% соответственно. Общая выборка пациентов разделена на две группы: со средним размером адипоцитов ЭЖТ менее или равным 87,32 мкм (группа 1) и более 87,32 мкм (группа 2). В группе 2 определялись более высокие значения индекса массы тела, окружностей талии и бедер, содержания триглицеридов, вчСРБ и более низкий уровень адипонектина, а медиана доли гипертрофированных адипоцитов была в три раза выше, чем в группе 1. Построена модель множественной логистической регрессии, согласно которой статистически значимыми детерминантами выраженной гипертрофии адипоцитов ЭЖТ являются снижение уровня адипонектина, рост вчСРБ и С-пептида, который отражает биосинтез и секрецию инсулина. Прогностическая точность модели составила 82%, чувствительность – 85%, специфичность – 79%, AUC = 0,89.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о тесной взаимосвязи между развитием гипертрофии адипоцитов ЭЖТ, нарушением продукции адипонектина, инсулина и процессами воспаления, причем концентрации адипонектина, вчСРБ и базального С-пептида в крови являются биомаркерами, с высокой точностью определяющими наличие гипертрофии адипоцита ЭЖТ.

Ключевые слова:	эпикардальная жировая ткань, адипоциты, адипонектин, высокочувствительный С-реактивный белок, С-пептид.
Конфликт интересов:	авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Прозрачность финансовой деятельности:	работа выполнена в рамках темы фундаментальных исследований № 122020300043-1; в работе использовано оборудование Центра коллективного пользования «Медицинская геномика».

Кошельская Ольга Анатольевна, e-mail: koshel@live.ru.

Соответствие принципам этики:	исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 210 от 18.02.2021 г.). Все лица, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие.
Для цитирования:	Кошельская О.А., Нарыжная Н.В., Кологривова И.В., Сулова Т.Е., Кравченко Е.С., Харитонов О.А., Андреев С.Л., Марголис Н.Ю., Шарыпова Н.Г., Крапивина А.С. Взаимосвязь гипертрофии эпикардиальных адипоцитов с адипокинами, воспалением и метаболизмом глюкозы и липидов. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):64–74. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-65-75 .

Correlation of epicardial adipocytes hypertrophy with adipokines, inflammation and glucose and lipid metabolism

Olga A. Koshelskaya¹, Natalya N. Naryzhnaya¹, Irina V. Kologrivova¹,
Tatiana E. Suslova¹, Olga A. Charitonova¹, Sergey L. Andreev¹,
Natalia Yu. Margolis¹, Natalia G. Sharipova¹, Anastasiya S. Krapivina²

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

² Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Moskovsky Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

The changes of epicardial adipose tissue's (EAT) morphofunctional characteristics represent an important factor of cardiometabolic impairments development. However, factor data determining the severity of EAT adipocytes' hypertrophy in patients with coronary atherosclerosis are absent in literature.

Aim: To compare the size of the EAT adipocyte and the percentage of hypertrophied adipocytes with the parameters of glucose/insulin metabolism, blood lipid transport function, adipokines' profile and serum levels of high sensitive C-reactive protein (hsCRP) in patients with chronic coronary artery disease (CAD) undergoing coronary artery bypass grafting (CABG); to establish statistically significant determinants of a pronounced degree of EAT adipocytes' hypertrophy.

Material and Methods. The study included 42 patients (m/f 28/14) aged 53–72 y.o. with CAD, who underwent CABG. The material for the study was EAT adipocytes obtained by the enzymatic method from intraoperative explants. The basal blood levels of glycemia, insulinemia, C-peptide, blood lipid transport function, adipokines and hsCRP were determined. The median indicators of the size of EAT adipocytes and the proportion of EAT adipocytes over 100 µm were 87.32 µm and 14.64%, respectively. The total sample of patients was divided into two groups: gr. 1 with an average size of EAT adipocytes less than or equal to 87.32 µm and gr. 2 with an average size of EAT adipocytes more than 87.32 µm. Gr. 2 had higher body mass index, waist and hip circumferences, triglycerides, hsCRP, and lower adiponectin levels, while the median proportion of hypertrophied adipocytes was three times higher than in group 1. A model of multiple logistic regression was constructed, according to which statistically significant determinants of the pronounced EAT adipocytes' hypertrophy are represented by the decreased level of adiponectin, and increased concentrations of hsCRP and C-peptide, which reflects the biosynthesis and secretion of insulin. The predictive accuracy of the model was 82%, sensitivity 85%, specificity 79%, AUC = 0.89.

Conclusion. Our results indicate a close correlation between the development of EAT adipocytes hypertrophy, impaired production of adiponectin, insulin, and inflammation processes. Concentrations of adiponectin, hsCRP, and basal C-peptide in the blood are biomarkers that accurately determine the presence of EAT adipocyte hypertrophy.

Keywords:	epicardial adipose tissue, adipocytes, adiponectin, hsCRP, C-peptide.
Conflict of interest:	the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interests related to the publication of this article.

Financial disclosure:	the work was carried out within the framework of the topic of fundamental research no. 122020300043-1; the work was performed using the equipment of the Center for Collective Use “Medical Genomics”.
Adherence to ethical standards:	the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association “Ethical principles for conducting scientific medical research involving humans” as amended in 2000 and “Rules of Clinical Practice in the Russian Federation”, approved by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated June 19, 2003 No. 266. The study was approved by the Institutional Biomedical Ethics Committee of Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science (protocol № 210 from 18 February 2021). All individuals included in the study signed an informed consent to participate.
For citation:	Koshelskaya O.A., Naryzhnaya N.N., Kologrivova I.V., Suslova T.E., Charitonova O.A., Andreev S.L., Margolis N.Yu., Sharipova N.G., Krapivina A.S. Correlation of epicardial adipocytes hypertrophy with adipokines, inflammation and glucose and lipid metabolism. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):64–74. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-64-74 .

Введение

Как известно, в силу выраженной метаболической и гуморальной активности, обуславливающей патологическое воздействие на структурно-функциональное состояние коронарных артерий, избыточное накопление эпикардальной жировой ткани (ЭЖТ) представляет собой важный фактор кардиометаболического риска [1].

Среди механизмов, опосредующих связь избыточной аккумуляции ЭЖТ с сердечно-сосудистой патологией, продемонстрированы нарушение баланса экспрессируемых этим жировым депо адипокинов [2], активация процессов локального и системного воспаления [3, 4], нарушение инсулиночувствительности [5] и развитие фиброза жировой ткани [6].

В силу изменения клеточной биохимии важная роль в патогенезе всех этих нарушений может принадлежать гипертрофии адипоцитов ЭЖТ, степень которой более значительна у пациентов с коронарным атеросклерозом в сравнении с лицами без этой патологии [7]. Тем не менее, литературные сведения о факторах, реализующих атерогенные эффекты гипертрофированных адипоцитов ЭЖТ в клинических условиях, весьма ограничены. В нашем недавнем пилотном исследовании показано, что возможными механизмами, опосредующими взаимосвязь между средним размером адипоцита ЭЖТ, степенью его гипертрофии и тяжестью коронарного атеросклероза, могут быть высокая степень инсулинорезистентности эпикардального адипоцита и дисбаланс продукции адипокинов [8]. Другим ключевым механизмом, ответственным за связь нарушений структуры и функции адипоцитов с атеросклерозом, может быть хроническое низкоинтенсивное воспаление [9], которое является как одной из причин нарушений функционирования гипертрофированных жировых клеток [10], так и их последствием [11].

Хотя в ряде исследований продемонстрирована тесная взаимосвязь между гипертрофией адипоцитов и воспалением жировой ткани различной локализации, которые нельзя объяснить лишь наличием ожирения или избыточной массы тела [12], сведения о потенциальной ассоциации размера адипоцита ЭЖТ и степени его гипертрофии с процессами хронического воспаления

у пациентов с коронарным атеросклерозом ограничены единичными публикациями [7]. До настоящего времени в литературе отсутствуют данные о факторах, определяющих выраженную степень гипертрофии адипоцита ЭЖТ у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Цель исследования: сопоставить размер адипоцита ЭЖТ и долю гипертрофированных адипоцитов с показателями метаболизма глюкозы/инсулина, липид-транспортной функции крови, адипокинового профиля и содержанием в сыворотке крови высокочувствительного С-реактивного белка (вСРБ) у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС), подвергнутых операции аортокоронарного шунтирования (АКШ); установить статистически значимые детерминанты выраженной степени гипертрофии адипоцитов ЭЖТ.

Материал и методы

В настоящее исследование включены 42 пациента (28 мужчин и 14 женщин) в возрасте 53–72 года с хронической стабильной ИБС и выраженным коронарным атеросклерозом, у которых имелись показания для проведения хирургической операции АКШ.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 146 от 16.06.2016 г.). Все лица, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие.

Все пациенты находились на регулярной медикаментозной терапии, приближающейся к оптимальной. Доля курильщиков и пациентов с метаболическими нарушениями, которые соответствовали критериям метаболического синдрома [13], была высокой. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Критериями исключения являлись острые атеросклеротические осложнения в течение последних 6 мес., лю-

бое острое воспалительное заболевание, хроническая болезнь почек выше СЗб, онкологические, гематологические и иммунные заболевания, сахарный диабет 1-го типа, отказ пациента от участия в исследовании.

Таблица 1. Клиническая характеристика включенных в исследование пациентов, $n = 42$

Table 1. Clinical parameters of patients, $n = 42$

Показатели Parameters	Значения Values
Пол, мужчины/женщины Gender, m/f	28/14
Возраст, лет Age, years	59 (56; 66)
Пациенты с инфарктом миокарда в анамнезе, n (%) History of myocardial infarction, n (%)	23 (54,8)
Пациенты с артериальной гипертензией, n (%) Arterial hypertension, n (%)	42 (100)
Пациенты с сахарным диабетом 2-го типа, n (%) Diabetes mellitus, n (%)	12 (28,6)
Длительность артериальной гипертензии, лет Duration of arterial hypertension, years	20 (15; 23)
Длительность ишемической болезни сердца, лет Duration of coronary artery disease, years	2 (2; 10)
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст. Systolic blood pressure, mm Hg	130 (123; 140)
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст. Diastolic blood pressure, mm Hg	80 (70; 85)
Пациенты-курильщики, n (%) Smoking, n (%)	17 (40,5)
Индекс массы тела, $\text{кг}/\text{м}^2$ Body Mass Index, kg/m^2	30,7 (28,1; 33,3)
Пациенты с ожирением, n (%) Obesity, n (%)	25 (59,5)
Окружность талии, см Waist circumference, cm	106,4 (100; 116)
Толщина ЭЖТ, мм EAT thickness, mm	5,23 (4,37; 6,30)
Индекс Gensini, баллы Gensini score, points	78 (42,5; 121)
Многососудистое поражение коронарных артерий, n (%) Multivessel coronary artery disease, n (%)	25 (59,5)

Примечание: ЭЖТ – эпикардиальная жировая ткань.

Note: EAT – epicardial adipose tissue.

Материалом для исследования явились экспланты ЭЖТ массой 0,2–1 г. Забор эксплантов у пациентов осуществлялся в ходе операции АКШ. Образцы помещали в среду M199 и в течение 15 мин доставляли в лабораторию. Выделение клеток жировой ткани осуществляли энзиматически, стерильно в ламинарном шкафу II-го класса защиты (БАВп-01-«Ламинар-с»-1,5, ЗАО «Ламинарные системы», Миасс, Россия). Ткань измельчали, инкубировали 35–40 мин при температуре 37 °С и постоянном мягком перемешивании (10 об/мин) в 5 мл стерильного раствора коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) 1 мг/мл в буфере Кребса – Рингера (2 mM D-глюкозы, 135 mM NaCl, 2,2 mM CaCl₂·2H₂O, 1,25 mM MgSO₄·7H₂O, 0,45 mM KH₂PO₄, 2,17 mM Na₂HPO₄, 25 mM HEPES, 3,5% BSA, 0,2 mM аденозина). Для нейтрализации коллагеназы добавляли буфер Кребса – Рингера в соотношении 1 : 1. Клеточную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр (Falcon™ Cell strainer, диаметр пор 100 мкм), трехкратно промывали теплым буфером Кребса – Рингера.

Количество и размер полученных адипоцитов подсчитывали в камере Горяева с использованием световой микроскопии (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия). Адипоциты диаметром более 100 мкм относили к гипертрофированным, степень выраженности гипертрофии эпикардиальных адипоцитов оценивали по показателю доли адипоцитов, имеющих диаметр более 100 мкм.

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание С-реактивного белка высокочувствительным методом (вЧСРБ), (Biomerica, Германия), инсулина (AccuBind, США), С-пептида (AccuBind, США), аполипопротеина В, аполипопротеина А1 (DiaSys, Германия), лептина (DBC, Канада) и адипонектина (Assaypro, США). Исследовали липидный спектр крови (содержание общего холестерина – ОХС, триглицеридов – ТГ, холестерина липопротеинов высокой плотности – ХС-ЛВП, холестерина липопротеинов низкой плотности – ХС-ЛНП), используя наборы ЗАО «Диакон-ДС» (Россия). Содержание глюкозы и гликированного гемоглобина в крови оценивали на автоматических анализаторах Konelab 60i (Thermo Fisher, США) и Cobas 6000 C501 (Rosche, США) соответственно.

Проводили антропометрические измерения с оценкой общего ожирения по уровню индекса массы тела (ИМТ) и абдоминального ожирения – по величине окружности талии.

Статистический анализ результатов исследования выполняли с помощью пакета программ STATISTICA 13.0 (StatSoftInc., USA). Проверку нормальности распределения выборочных данных производили по критерию Шапиро – Уилка. Для описания признаков с отличным от нормального распределения использовали медиану (Me) и межквартильный интервал ($Q_1; Q_3$). Проверку значимости различий между количественными признаками при отсутствии нормальности распределения данных проводили по критерию Манна – Уитни. Доли мужчин и женщин в группах 1 и 2 сравнивались по χ^2 -критерию Пирсона. Для оценки взаимосвязи признаков использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Для оценки прогностической значимости признаков, предсказывающих степень гипертрофии адипоцитов ЭЖТ, была построена модель множественной логистической регрессии. Пороговый уровень статистической значимости при проверке гипотез составлял $p = 0,05$.

Результаты

Медиана среднего размера адипоцита ЭЖТ у пациентов с коронарным атеросклерозом составила 87,32 (83,77; 90,94) мкм. Медиана доли адипоцитов ЭЖТ, размер которых превышает 100 мкм, в нашей выборке составила 14,6 (8,9; 28,2) %. Средний размер адипоцита ЭЖТ и доля адипоцитов ЭЖТ, размер которых превышает 100 мкм, имели сильную корреляционную связь ($r_s = 0,928$).

Вся выборка была разделена на две группы одинакового размера ($n = 21$) в зависимости от среднего размера адипоцитов в их интраоперационных эксплантах ЭЖТ: у пациентов группы 1 средний размер адипоцита ЭЖТ не превышал 87,32 мкм, у пациентов группы 2 был более 87,32 мкм. Медианы размера адипоцита ЭЖТ в группах различались на 7,16 мкм ($p < 0,001$), а медиана доли гипертрофированных адипоцитов в группе 2 в три раза превышала значения этого показателя в группе 1 (табл. 2). Как видно из таблицы 2, у пациентов группы 2 обнаружены также более высокие значения ИМТ, окружности талии и окружности бедер.

Таблица 2. Антропометрические показатели ожирения, толщина эпикардиальной жировой ткани и морфометрические параметры эпикардиального адипоцита в зависимости от их среднего размера

Table 2. Anthropometric parameters of obesity, thickness of epicardial adipose tissue and morphometric characteristics of epicardial adipocyte depending on their average size

Параметры Parameters	Группа 1 Диаметр адипоцита ЭЖТ ≤ 87,32 мкм (n = 21) Group 1 EAT adipocyte diameter ≤ 87,32 μm (n = 21)	Группа 2 Диаметр адипоцита ЭЖТ > 87,32 мкм (n = 21) Group 2 EAT adipocyte diameter > 87,32 μm (n = 21)	p
Мужчины/ женщины, n (%) Men/women, n (%)	13 (61,9)/8(38,1)	15 (71,4)/6(28,6)	0,53
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	29,2 (27,0; 31,2)	32,8 (29,9; 35,4)	0,036
Окружность талии, см Waist circumference, cm	102 (76; 128)	112 (99; 122)	0,010
Окружность бедер, см Hips circum- ference, cm	104 (101; 108)	110 (105; 117)	0,037
Толщина ЭЖТ, мм EAT thickness, mm	5,05 (4,37; 6,15)	5,45 (4,35; 6,60)	0,69
Размер адипоцита ЭЖТ, мкм EAT adipocyte size, μm	83,79 (79,27; 86,03)	90,95 (89,09; 95,13)	< 0,0001
% адипоцитов >100 мкм % EAT adipo- cyte > 100 μm	8,88 (5,91; 10,82)	28,22 (18,24; 34,75)	< 0,0001

Примечание: ЭЖТ – эпикардиальная жировая ткань; здесь и далее p – уровень значимости различий показателя в группах 1 и 2 по критерию Манна – Уитни.

Note: EAT – epicardial adipose tissue; here and below p is the level of significance of differences between the indicators in groups 1 and 2 according to the Mann – Whitney test.

У пациентов группы 2 определялось более высокое содержание базального С-пептида и триглицеридов в сыворотке крови (табл. 3). Значимых межгрупповых различий базальной гликемии, уровней ХС ЛНП и апоВ не отмечено, однако медианные значения этих показателей имели тенденцию к повышению при наличии более высокой степени гипертрофии адипоцитов ЭЖТ (см. табл. 3).

После коррекции значений адипонектина сыворотки крови на имеющиеся межгрупповые различия по ИМТ и полу содержание адипонектина и значения адипонектин/лептин у пациентов с более выраженной гипертрофией адипоцитов ЭЖТ остались значимо ниже таковых в группе 1. Различий содержания лептина крови между группами не было выявлено: в обеих группах концентрация лептина была высокой (табл. 4).

Таблица 3. Показатели метаболизма глюкозы/инсулина и липид-транспортной функции крови в зависимости от размера адипоцита эпикардиальной жировой ткани

Table 3. Parameters of glucose/insulin metabolism and blood lipid transport function depending on epicardial adipose tissue adipocyte size

Параметры Parameters	Группа 1 Диаметр адипоцита ЭЖТ ≤ 87,32 мкм (n = 21) Group 1 EAT adipocyte diameter ≤ 87,32 μm (n = 21)	Группа 2 Диаметр адипоцита ЭЖТ > 87,32 мкм (n = 21) Group 2 EAT adipocyte diameter > 87,32 μm (n = 21)	p
Гликемия, ммоль/л Basal glycaemia, mmol/l	6,07 (5,76; 7,04)	6,36 (5,99; 6,67)	0,61
Базальная гликемия, ммоль/л Basal glycaemia, mmol/l	5,6 (5,1; 6,04)	6,21 (5,70; 6,79)	0,078
Базальная инсулинемия, мЕд/мл Basal insulinemia, μU/ml	6,02 (2,64; 8,65)	4,65 (2,66; 5,4)	0,300
Базальный С-пептид, нг/мл Basal C-peptide, ng/ml	2,15 (1,73; 2,75)	2,78 (2,18; 3,1)	0,030
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/l	1,2 (0,9; 1,37)	1,7 (1,41; 2,16)	0,007
Холестерол липопротеинов высокой плотности, ммоль/л High-density lipoprotein cholesterol, mmol/l	1,04 (0,88; 1,18)	0,99 (0,86; 1,16)	0,40
Холестерол липопротеинов низкой плотности, ммоль/л Low-density lipoprotein cholesterol, mmol/l	2,0 (1,75; 2,4)	2,21 (1,62; 2,56)	0,082
Аполипопротеин В, мг/дл Apolipoprotein B, mg/dl	90,16 (67,28; 112,34)	112,34 (91,82; 136,82)	0,08
Аполипопротеин А ₁ , мг/дл Apolipoprotein A ₁ , mg/dl	140,12 (121,07; 167,56)	148,06 (134,13; 168,42)	0,49
Аполипопротеин В/Аполипопротеин А ₁ Apolipoprotein B/Apolipoprotein A ₁	0,61 (0,45; 0,76)	0,73 (0,55; 0,92)	0,23

Примечание: ЭЖТ – эпикардиальная жировая ткань.

Note: EAT – epicardial adipose tissue.

На рисунке 1 представлено межгрупповое сравнение концентрации вЧСРБ.

В группе пациентов со средним диаметром адипоцитов > 87,32 мкм концентрация вЧСРБ была значимо выше, чем в группе пациентов со средним диаметром адипоцитов ≤ 87,32 мкм, и у большинства пациентов превышала пороговый уровень 3 мг/л, специфический для наличия низкоинтенсивного воспаления и повышенного риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов.

Таблица 4. Содержание адипонектина и лептина в сыворотке крови пациентов в зависимости от размера адипоцита эпикардиальной жировой ткани после коррекции на различия по полу и индекса массы тела

Table 4. The levels of adiponectin and leptin in the blood serum of patients depending on epicardial adipose tissue adipocyte size after values adjusted for gender and body mass index difference

Параметры Parameters	Группа 1 Диаметр адипоцита ЭЖТ ≤ 87,32 мкм (n = 21) Group 1 EAT adipocyte diameter ≤ 87,32 μm (n = 21)	Группа 2 Диаметр адипоцита ЭЖТ > 87,32 мкм (n = 21) Group 2 EAT adipocyte diameter > 87,32 μm (n = 21)	p
	Адипонектин, мкг/мл Adiponectin, μg/ml	8,97 (6,18; 11,78)	
Лептин, нг/мл Leptin, ng/ml	20,74 (8,31; 34,97)	17,64 (9,61; 29,49)	0,760
Адипонектин/ Лептин Adiponectin/Leptin	0,69 (0,18; 1,36)	0,28 (0,12; 0,37)	0,010

Примечание: ЭЖТ – эпикардиальная жировая ткань; референсные концентрации по данным производителя набора: адипонектин у мужчин – 5,6–13,4 мкг/мл, у женщин – 7,1–19,3 мкг/мл, лептин у мужчин – 3,7–11,1 нг/мл, у женщин – 2,0–5,6 нг/мл.

Note: EAT – epicardial adipose tissue; reference concentrations according to the manufacturer of the kit: adiponectin in men – 5.6-13.4 μg/ml; in women – 7.1-19.3 μg/ml; leptin in men – 3.7-11.1 ng/ml; in women – 2.0-5.6 ng/ml.

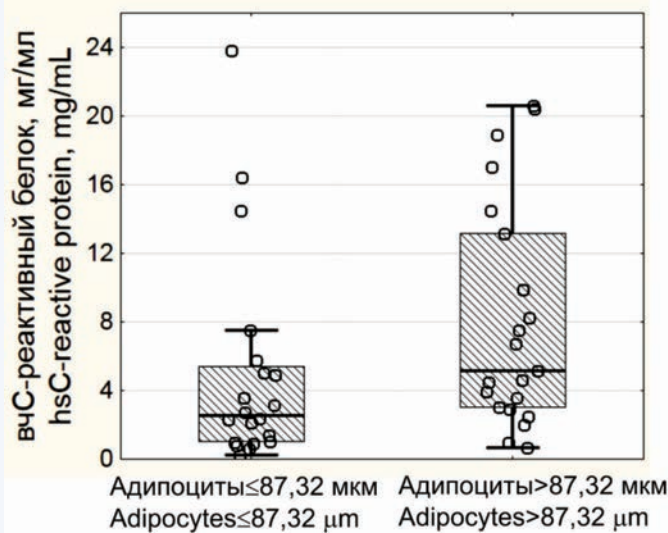


Рис. 1. Концентрация высокочувствительного С-реактивного белка в зависимости от размера адипоцита эпикардиальной жировой ткани

Fig.1. The concentration of high sensitive C-reactive protein depending on the size of epicardial adipose tissue adipocyte

Как оказалось, размер адипоцита ЭЖТ и доля гипертрофированных адипоцитов ЭЖТ демонстрировали прямые корреляционные связи с ИМТ, окружностью та-

лии и бедер (табл. 5), тогда как каких-либо взаимосвязей морфометрических показателей адипоцитов с толщиной ЭЖТ обнаружено не было.

Таблица 5. Корреляционные связи размера адипоцита эпикардиальной жировой ткани и степени его гипертрофии с антропометрическими показателями ожирения и толщиной эпикардиальной жировой ткани

Table 5. Correlations of epicardial adipose tissue adipocyte size and the degree of its hypertrophy with anthropometric parameters of obesity and epicardial adipose tissue thickness

Показатели Parameters	Размер адипоцита эпикардиальной жировой ткани Epicardial adipose tissue adipocyte size		Доля адипоцитов эпикардиальной жировой ткани > 100 мкм % Epicardial adipose tissue adipocyte > 100 μm	
	r_s	p	r_s	p
Индекс массы тела Body mass index	0,46	0,002	0,49	0,001
Окружность талии Waist circumference	0,55	0,0001	0,54	0,0002
Окружность бедер Hips circumference	0,39	0,01	0,43	0,004
Окружность талии/Окружность бедер Waist circumference/Hips circumference	0,37	0,017	0,33	0,03
Толщина эпикардиальной жировой ткани Epicardial adipose tissue thickness	0,18	0,28	0,13	0,43

Установлено, что размер адипоцита ЭЖТ и степень выраженности его гипертрофии имели прямые корреляционные связи с базальной гликемией, содержанием базального С-пептида, уровнями ТГ, апоВ и соотношением ТГ/ХС ЛВП (табл. 6). Кроме того, были обнаружены обратные связи размера и степени гипертрофии адипоци-

та ЭЖТ с содержанием адипонектина сыворотки крови и соотношением адипонектин/лептин: $r_s = -0,41$ и $r_s = -0,36$; и $r_s = -0,37$ и $r_s = -0,40$ соответственно (табл. 7), тогда как корреляционная связь между морфометрическими показателями адипоцита ЭЖТ и содержанием лептина в сыворотке крови отсутствовала.

Таблица 6. Корреляционные связи размера адипоцита эпикардиальной жировой ткани и степени его гипертрофии с показателями метаболизма глюкозы/инсулина и липидтранспортной функции крови

Table 6. Correlations of epicardial adipose tissue adipocyte size and the degree of its hypertrophy with parameters of glucose/insulin metabolism and blood lipid transport function

Показатели Parameters	Размер адипоцита эпикардиальной жировой ткани Epicardial adipose tissue adipocyte size		Доля адипоцитов эпикардиальной жировой ткани > 100 мкм % Epicardial adipose tissue adipocyte > 100 μm	
	r_s	p	r_s	p
Базальная гликемия Basal glycemia	0,40	0,009	0,44	0,003
Базальная инсулинемия Basal insulinemia	-0,16	0,29	-0,03	0,85
Базальный С-пептид Basal C-peptide	0,41	0,008	0,49	0,001
Триглицериды Triglycerides	0,49	0,001	0,48	0,001
Триглицериды/Холестерол липопротеинов высокой плотности TG/ High-density lipoprotein cholesterol	0,37	0,017	0,33	0,03
Холестерол липопротеинов низкой плотности Low-density lipoprotein cholesterol	0,09	0,59	0,15	0,33
Аполипопротеин В Apolipoprotein B	0,36	0,034	0,34	0,047
Аполипопротеин А ₁ Apolipoprotein A ₁	0,18	0,302	0,05	0,793

Note: TG – triglycerides.

Таблица 7. Корреляционные связи размера адипоцита эпикардиальной жировой ткани и степени его гипертрофии с содержанием адипонектина и лептина в сыворотке крови

Table 7. Correlations of epicardial adipose tissue adipocyte size and the degree of its hypertrophy with levels of adiponectin and leptin in the blood serum of patients

Показатели Parameters	Размер адипоцита эпикардиальной жировой ткани Epicardial adipose tissue adipocyte size		Доля адипоцитов эпикардиальной жировой ткани > 100 мкм % Epicardial adipose tissue adipocyte > 100 μm	
	r_s	p	r_s	p
Адипонектин Adiponectin	-0,41	0,009	-0,36	0,02
Лептин Leptin	0,01	0,95	0,08	0,60
Адипонектин/ Лептин Adiponectin/ Leptin	-0,37	0,02	-0,40	0,01

Построение модели множественной линейной регрессии оказалось невозможным из-за отсутствия нормальности остатков этой модели при предварительном анализе статистических данных. Была построена модель множественной логистической регрессии, позволившая выявить значимые детерминанты гипертрофии адипоцитов ЭЖТ и классифицировать пациентов в группы с различной степенью ее выраженностью (табл. 8).

Хотя корреляционные связи между размером адипоцита ЭЖТ, долей адипоцитов более 100 мкм и содержанием вЧСРБ отсутствовали, значения этого показателя у пациентов с выраженной гипертрофией эпикардиальных адипоцитов были значимо выше, и включение вЧСРБ в

модель логистической регрессии в качестве предиктора гипертрофии адипоцита ЭЖТ улучшило прогностическое и информационное качества модели.

Коэффициент псевдодетерминации Найджелкерка построенной модели $R_N^2 = 0,59$. Уровень значимости модели в целом $p = 0,000045$. Для показателя «адипонектин» ОШ 0,665; 95% ДИ ОШ (0,454; 0,973), для показателя «базальный С-пептид» ОШ 4,956; 95% ДИ ОШ (1,070; 22,981). Прогностические характеристики модели: точность – 82%, чувствительность – 85%, специфичность – 79%, AUC = 0,89.

На рисунке 2 приведена ROC-кривая модели. Пороговая вероятность разной степени выраженности гипертрофии адипоцитов ЭЖТ составила 0,57.

Таблица 8. Оценки коэффициентов модели множественной логистической регрессии и уровни их значимости**Table 8.** Coefficient estimates of the multiple logistic regression mode and their significance level

Показатели Parameters	Оценка коэффициента Coefficient estimati	p
Свободный член Free member	-1,514	0,504
#Адипонектин #Adiponectin	-0,408	0,036
вЧСРБ hsCRP	0,060	0,284
Базальный С-пептид Basal C-peptide	1,601	0,041

Примечание: # – значения скорректированы с учетом различий по полу и индексу массы тела.

Note: # – values adjusted for gender and body mass index differ nces.

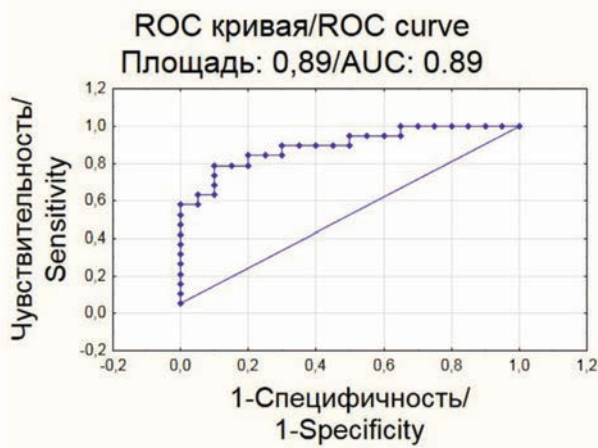


Рис. 2. ROC-кривая модели множественной логистической регрессии для классификации пациентов в группы 1 и 2 с разной степенью гипертрофии адипоцитов эпикардиальной жировой ткани
Fig. 2. ROC curve of a multiple logistic regression model for classifying patients into groups 1 and 2 with different degrees of epicardi l adipose tissue adipocyte hypertrophy

Обсуждение

В настоящем исследовании в ходе сопоставления морфологических характеристик адипоцита ЭЖТ с показателями метаболизма, адипокинового профиля и содержанием в сыворотке крови вЧСРБ было установлено, что средний размер адипоцита ЭЖТ > 87,32 мкм и количество гипертрофированных адипоцитов ЭЖТ > 14,6% ассоциированы с ростом базальных уровней гликемии и С-пептида, содержания триглицеридов, апоВ, соотношения ТГ/ХС ЛВП, сниженным уровнем адипонектина крови.

Мы впервые показали, что у пациентов с коронарным атеросклерозом выраженная гипертрофия адипоцитов ЭЖТ ассоциирована со снижением в крови уровня адипонектина и повышением содержания С-пептида и вЧСРБ. Следует отметить, что по данным нашего предыдущего исследования, в которое включались мужчины и женщины с разной степенью выраженности коронарного атеросклероза и метаболических нарушений, само по себе утолщение ЭЖТ не вносило значимого вклада в формирование гипертрофии адипоцитов ЭЖТ [8]. Вместе с тем гипертрофия адипоцитов ЭЖТ может являться как причиной развития низкоинтенсивного воспаления и метаболической дисфункции [10], так и их следствием [11].

В исследовании N. Franck и соавт. (2007) было установлено, что размер адипоцитов подкожной жировой ткани ассоциировался с уровнем резистентности к инсулину [14]. Так, гипертрофированные адипоциты характеризовались более низкой экспрессией транспортера глюкозы GLUT-4 в ответ на стимуляцию инсулином по сравнению с мелкими адипоцитами [14]. Увеличение среднего размера адипоцита ассоциировалось с возрастанием активности липолиза и нарушением инсулин-опосредованного захвата глюкозы [5].

Несмотря на то, что была продемонстрирована связь толщины ЭЖТ с уровнем инсулинорезистентности [15], работы, посвященные изучению влияния чувствительности к инсулину на морфофункциональные свойства эпикардиальных адипоцитов, являются крайне немногочисленными в связи с малой доступностью клеток эпикардиального жирового депо. Ранее мы установили зависимость между способностью адипоцитов ЭЖТ к инсулин-индуцированной продукции активных форм кислорода и уровнями базального и постпрандиального инсулина у пациентов с коронарным атеросклерозом [8]. Определение содержания С-пептида имеет преимущества перед инсулином, поскольку он характеризуется большей стабильностью и не интерферирует с экзогенным инсулином, принимаемым с терапевтическими целями [16]. Повышенное содержание С-пептида является маркером инсулинорезистентности, метаболического синдрома и ассоциируется с сердечно-сосудистой и общей летальностью у пациентов без диабета [16].

В крови здоровых пациентов базовая концентрация вЧСРБ составляет 1 мг/л и ниже. Небольшое повышение базового уровня вЧСРБ от 1 до 3 мг/л ассоциируется с увеличением кардиоваскулярного риска, а его более высокие концентрации могут указывать на высокий и очень высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний. Взаимосвязь вЧСРБ с ожирением и инсулинорезистентностью была продемонстрирована в клиническом исследовании корейских исследователей, которые показали, что вЧСРБ в комбинации с ИМТ являются более значимыми предикторами развития инсулинорезистентности, чем оба этих предиктора по-отдельности [17], что обосновывает поиск терапевтических подходов, направленных одновременно на снижение воспаления и ожирения у пациентов с кардиометаболической патологией. Имеются данные о том, что уровни циркулирующего вЧСРБ связаны с эпикардиальными и висцеральными жировыми отложениями у женщин с метаболическим синдромом [4]. В настоящей работе мы не смогли провести анализ влияния гендер-

ного фактора на взаимосвязь размера адипоцита ЭЖТ с уровнем вЧСРБ в связи с относительно небольшим объемом выборки, однако предполагаем изучить данный вопрос в ходе дальнейших исследований.

Согласно полученным нами данным, установлены обратные корреляционные связи между содержанием адипонектина, средним размером адипоцита ЭЖТ и долей гипертрофированных эпикардиальных адипоцитов. Важная роль адипонектина в детерминации размера эпикардиальных адипоцитов была подтверждена нами в ходе логистического анализа, по результатам которого сниженный уровень адипонектина, наряду с повышенным содержанием вЧСРБ и С-пептида, идентифицирован как значимый маркер гипертрофии жировых клеток эпикардиального жирового депо. Полученные нами результаты о низком уровне сывороточного адипонектина у пациентов с коронарным атеросклерозом и выраженной гипертрофией эпикардиальных адипоцитов соответствуют литературным данным о сниженной экспрессии адипонектина в ЭЖТ при ИБС [18]. Тем не менее, мы не можем утверждать, что дефицит адипонектина, выявленный нами у пациентов с высокой долей гипертрофированных адипоцитов, обусловлен исключительно дисфункцией ЭЖТ, поскольку имеются данные о наибольшем вкладе подкожной жировой ткани в продукцию этого адипокина [1]. Вместе с тем гипертрофия адипоцитов ЭЖТ, по-видимому, отражает системные процессы ожирения, так как размер и доля гипертрофированных адипоцитов ЭЖТ коррелировали с антропометрическими показателями ожирения и не имели ассоциаций с толщиной ЭЖТ. При этом системный дефицит адипонектина, выявленный в нашем исследовании, может вносить вклад в ограничение процессов гиперплазии адипоцитов и способствовать усилению воспаления в ЭЖТ [8].

Исчерпывающих литературных сведений об особенностях морфофункциональных характеристик адипоцитов ЭЖТ и их потенциальных взаимосвязях с состоянием системного метаболизма и содержанием биомаркеров воспаления у пациентов с коронарным атеросклерозом мы не обнаружили. Вместе с тем имеются данные о том, что в сравнении с жировыми клетками других локализаций эпикардиальные адипоциты обладают более высокой способностью к липогенезу и липолизу, а также демонстрируют повышенную экспрессию генов, связанных с провоспалительными цитокинами [19]. У пациентов с коронарным атеросклерозом обнаружено уникальное изменение транскриптома ЭЖТ, проявляющееся дифференциальной экспрессией провоспалительных и апоптотических генов и увеличением размера эпикардиальных адипоцитов [20], что подтверждают и другие авторы [7]. Вклад метавоспаления в развитие дисфункции ЭЖТ требует дальнейшего более глубокого изучения и будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Ограничениями нашего исследования являются его одномоментный дизайн и небольшая выборка пациентов, не позволяющая установить потенциальные гендерные различия в экспрессии воспалительных и кардиометаболических биомаркеров у пациентов.

Заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют о тесной взаимосвязи между развитием гипертрофии адипоцитов ЭЖТ, нарушением продукции адипонектина, инсулина и процессами воспаления. Мы впервые показали, что концентрации адипонектина, вЧСРБ и базального С-пептида в крови являются биомаркерами, с высокой точностью определяющими наличие гипертрофии адипоцита ЭЖТ.

Литература / References

- Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nature Reviews. Cardiology*. 2022;19(9):593–606. DOI: 10.1038/s41569-022-00679-9.
- Yanai H., Yoshida H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1190. DOI: 10.3390/ijms20051190.
- Koshelskaya O.A., Suslova T.E., Kologrivova I.V., Margolis N.Y., Zhuravleva O.A., Kharitonova O.A. et al. Epicardial fat thickness and biomarkers of inflammation in patients with stable coronary artery disease: correlation with the severity of coronary atherosclerosis. *Russian Journal of Cardiology*. 2019;(4):20–26. DOI: 10.15829/1560-4071-2019-4-20-26.
- Carbone F., Lattanzio M.S., Minetti S., Ansaldo A.M., Ferrara D., Molina-Molina E. et al. Circulating CRP levels are associated with epicardial and visceral fat depots in women with metabolic syndrome criteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):5981. DOI: 10.3390/ijms20235981.
- Stenkula K.G., Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2018;315(2):R284–R295. DOI: 10.1152/ajpregu.00257.2017.
- Ishii Y., Abe I., Kira S., Harada T., Takano M., Oniki T. et al. Detection of fibrotic remodeling of epicardial adipose tissue in patients with atrial fibrillation: Imaging approach based on histological observation. *Heart Rhythm O2*. 2021;2(4):311–323. DOI: 10.1016/j.hroo.2021.05.006.
- Vianello E., Dozio E., Arnaboldi F., Marazzi M.G., Martinelli C., Lamont J. et al. Epicardial adipocyte hypertrophy: Association with M1-polarization and toll-like receptor pathways in coronary artery disease patients. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. 2016;26(3):246–253. DOI: 10.1016/j.numecd.2015.12.005.
- Naryzhnaya N.V., Koshelskaya O.A., Kologrivova I.V., Kharitonova O.A., Evtushenko V.V., Boshchenko A.A. Hypertrophy and insulin resistance of epicardial adipose tissue adipocytes: Association with the coronary artery disease severity. *Biomedicine*. 2021;9(1):64. DOI: 10.3390/biomedicine9010064.
- Murdolo G., Smith U. The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*. 2006;16(1):S35–S38. DOI: 10.1016/j.numecd.2005.10.016.
- Klein M., Varga I. Microenvironment of immune cells within the visceral adipose tissue *Sensu Lato* vs. epicardial adipose tissue: What do we know? *Inflammation*. 2018;41(4):1142–1156. DOI: 10.1007/s10753-018-0798-3.
- Wadey R.M., Connolly K.D., Mathew D., Walters G., Rees D.A., James P.E. Inflammatory adipocyte-derived extracellular vesicles promote leukocyte attachment to vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2019;283:19–27. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.013.
- Aitken-Buck H.M., Babakr A.A., Coffey S., Jones P.P., Tse R.D., Lamberts R.R. Epicardial adipocyte size does not correlate with body mass index. *Cardiovascular Pathology*. 2019;43:107144. DOI: 10.1016/j.carpath.2019.07.003.
- Ахмеджанов Н.М., Бутрова С.А., Дедов И.И., Кисляк О.А., Звенигородская Л.А., Кошельская О.А. и др. Консенсус российских экспертов по проблеме метаболического синдрома в Российской Федерации: определение, диагностические критерии, первичная профилактика и лечение. *Профилактическая медицина*. 2010;13(5):27–32. [Akhmedzhanov N.M., Butrova S.A., Dedov I.I., Kislyak O.A., Zvenigorodskaya L.A., Koshelskaya O.A. et al. Russian experts' consensus on metabolic syndrome problem in the Russian Federation: definition, diagnostic criteria, primary prevention, and treatment. *The Russian Journal of Preventive Medicine*. 2010;13(5):27–32. (In Russ.)].
- Franck N., Stenkula K.G., Ost A., Lindström T., Strålfors P., Nystrom F.H. Insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane is blunted in large compared with small primary fat cells isolated from the same individual. *Diabetologia*. 2007;50(8):1716–1722. DOI: 10.1007/s00125-007-0713-1.

15. Villasante Fricke A.C., Iacobellis G. Epicardial Adipose Tissue: Clinical biomarker of cardio-metabolic risk. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):E5989. DOI: 10.3390/ijms20235989.
16. Leighton E., Sainsbury C.A., Jones G.C. A practical review of C-peptide testing in diabetes. *Diabetes Ther*. 2017;8(3):475–487. DOI: 10.1007/s13300-017-0265-4.
17. Kim G.R., Choi D.W., Nam C.M., Jang S.I., Park E.C. Synergistic association of high-sensitivity C-reactive protein and body mass index with insulin resistance in non-diabetic adults. *Scientific Reports*. 2020;10(1):18417. DOI: 10.1038/s41598-020-75390-1.
18. Bambace C., Sepe A., Zoico E., Telesca M., Oliosio D., Venturi S. et al. Inflammatory profile in subcutaneous and epicardial adipose tissue in men with and without diabetes. *Heart Vessels*. 2014;29(1):42–48. DOI: 10.1007/s00380-012-0315-9.
19. Yim J., Rabkin S.W. Differences in gene expression and gene associations in epicardial fat compared to subcutaneous fat. *Horm. Metab. Res*. 2017;49(5):327–337. DOI: 10.1055/s-0042-119202.
20. McAninch E.A., Fonseca T.L., Poggioli R., Panos A.L., Salerno T.A., Deng Y. et al. Epicardial adipose tissue has a unique transcriptome modified in severe coronary artery disease. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(6):1267–1278. DOI: 10.1002/oby.21059.

Вклад авторов

Кошельская О.А. – разработка концепции и дизайна исследования, статистический анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

Нарыжная Н.В. – разработка концепции и проведение экспериментальных исследований, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

Кологривова И.В. – проведение лабораторных исследований и интерпретация данных, подготовка текста статьи, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания.

Суслова Т.Е. – разработка концепции исследования, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

Харитоновна О.А., Кравченко Е.С., Шарыпова Н.Г., Крапивина А.С. – проведение исследований и интерпретация данных.

Марголис Н.Ю. – статистический анализ и интерпретация данных.

Андреев С.Л. – забор интраоперационного материала, интерпретация данных.

Information on author contributions

Koshelskaya O.A. developed the concept and design of the study, analyzed and interpreted data, wrote the text of the manuscript, provided rationale for the manuscript, revised the essential intellectual content, and approved the final version of the manuscript for publication

Naruzhnaya N.V. developed the concept and design of the study, performed experimental studies, provided rationale for the manuscript, revised the essential intellectual content, and approved the final version of the manuscript for publication.

Kologrivova I.V. performed laboratory studies and interpreted data, wrote the text of the manuscript, provided rationale for the manuscript, revised the essential intellectual content.

Suslova T.E. developed the concept and design of the study, provided rationale for the manuscript, revised the essential intellectual content, and approved the final version of the manuscript for publication

Kharitonova O.A., Kravchenko E.S., Sharipova N.G., Krapivina A.S. performed studies and interpreted data.

Margolis N.Yu. performed statistical analysis and interpretation.

Andreev S.L. obtained intraoperative samples, and interpreted data.

Сведения об авторах

Кошельская Ольга Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-6679-1269.

E-mail: koshel@live.ru.

Нарыжная Наталья Владимировна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-2264-1928.

E-mail: natalynar@yandex.ru.

Кологривова Ирина Вячеславовна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-4537-0008.

E-mail: ikologrivova@gmail.com.

Суслова Татьяна Евгеньевна, канд. мед. наук, заведующий отделением клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9645-6720.

E-mail: tes@cardio-tomsk.ru.

Кравченко Елена Сергеевна, младший научный сотрудник, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-1235-9956.

E-mail: nikonovaes@gmail.com.

Харитоновна Ольга Анатольевна, младший научный сотрудник, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца,

Information about the authors

Olga A. Koshelskaya, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Research Scientist, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-6679-1269.

E-mail: koshel@live.ru.

Natalia V Naryzhnaya, Dr. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-2264-1928.

E-mail: natalynar@yandex.ru.

Irina V. Kologrivova, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-4537-0008.

E-mail: ikologrivova@gmail.com.

Tatiana E. Suslova, Cand. Sci. (Med.), Head of Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-9645-6720.

E-mail: tes@cardio-tomsk.ru.

Elena S. Kravchenko, Junior Research Scientist, Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-1235-9956.

E-mail: nikonovaes@gmail.com.

Olga A. Charitonova, Junior Research Scientist, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-2818-5882.

E-mail: hoa@cardio-tomsk.ru.

Sergey L. Andreev, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Department of Cardiovascular Surgery, Cardiology Research Institute, Tomsk



Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-2818-5882.

E-mail: hoa@cardio-tomsk.ru.

Андреев Сергей Леонидович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, отделение сердечно-сосудистой хирургии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-4049-8715.

E-mail: anselen@rambler.ru.

Марголис Наталья Юрьевна, канд. техн. наук, специалист по био-медицинской статистике, отдел координации научной и образовательной деятельности, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-8890-9814.

E-mail: nmargolis@yandex.ru.

Шарыпова Наталья Гавриловна, врач, отделение клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9794-5489.

E-mail: SANG33@ya.ru.

Крапивина Анастасия Сергеевна, студент, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-6850-182X.

E-mail: ya.anastasiya.krapivina99@yandex.ru.

Кошельская Ольга Анатольевна, e-mail: koshel@live.ru.

Поступила 10.01.2023

National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-4049-8715.

E-mail: anselen@rambler.ru.

Natalia Yu. Margolis, Cand. Sci. (Techn.), Specialist in Biomedical Statistics, Department for Coordination of Scientific and Educational Activities, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-8890-9814.

E-mail: nmargolis@yandex.ru.

Natalia G. Sharipova, Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-9794-5489.

E-mail: SANG33@ya.ru.

Anastasiya S. Krapivina, Student, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-6850-182X.

E-mail: ya.anastasiya.krapivina99@yandex.ru.

Olga A. Koshelskaya, e-mail: koshel@live.ru.

Received January 10, 2023



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-75-81>
УДК 616.13-004.6-007.271:617.58]-089.844:612.135

Изменение колебательных и нелинейно-динамических процессов микроциркуляции у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей после реваскуляризации

А.П. Васильев, Н.Н. Стрельцова

Тюменский кардиологический научный центр – филиал Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук,
625026, Российская Федерация, Тюмень, ул. Мельникайте, 111

Аннотация

Цель: изучить характер изменения колебательных и нелинейно-динамических процессов в микроциркуляторном русле кожи методом лазерной доплеровской флоуметрии у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК) после реваскуляризации конечности.

Материал и методы. Исследованы 27 пациентов мужского пола с ОААНК до и после эндоваскулярной реваскуляризации пораженной конечности (медианный возраст –63,0 [60,0; 69,0] года). Микроциркуляцию (МЦ) кожи стопы с оценкой нелинейных динамических процессов и спектрального вейвлет-анализа колебаний кровотока исследовали методом лазерной доплеровской флоуметрии. Определяли нормированные амплитудные показатели колебаний кровотока в частотных диапазонах, отражающих: эндотелиальный, нейрогенный, миогенный, респираторный, пульсовой факторы гемодинамики. Рассчитывали показатели шунтирования и нутритивного кровотока. Проводили окклюзионную пробу с определением резерва капиллярного кровотока. Исследование нелинейных динамических процессов включало оценку фрактальной размерности, определение энтропии и анализ фазового портрета.

Результаты. Реваскуляризация конечности у пациентов с ОААНК приводила к улучшению клинической картины, сопровождающемуся статистически значимым ростом нутритивного кровотока (+9,7%), резервного дилатационного потенциала микрососудов (+43,2%), уменьшением артериоло-венулярного шунтирования крови (–5,0%) и снижением венозного полнокровия (–14,3%). Анализ нелинейных динамических процессов МЦ показал, что после ангиопластики на фоне сохраняющегося дефицита энергии колебательных процессов отмечалось снижение показателя фрактальной размерности (–14,3%), свидетельствуя об ограничении лабильности функциональной системы микрососудистого русла. В то же время установлено возрастание хаотизации регуляторных механизмов периферического кровотока.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о позитивных функциональных сдвигах МЦ русла на фоне улучшения клинической картины у пациентов с ОААНК после реваскуляризации конечности. При этом изменение параметров нелинейной динамики указывает на компенсаторное увеличение хаотизации системы на фоне сохраняющегося ограничения ее функциональной лабильности и дефицита энергии колебательных процессов.

Ключевые слова:	облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, микроциркуляция, лазерная доплеровская флоуметрия, нелинейная динамика, реваскуляризация конечности.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Соответствие принципам этики:	от каждого пациента до начала исследования получено информированное согласие. Исследование одобрено Комитетом по биометрической этике Тюменского кардиологического научного центра (протокол № 128 от 21.02.2017 г.).
Для цитирования:	Васильев А.П., Стрельцова Н.Н. Изменение колебательных и нелинейно-динамических процессов микроциркуляции у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей после реваскуляризации. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.</i> 2023;38(1):75–81. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-75-81 .

Васильев Александр Петрович, e-mail: sss@infarkta.net.

Changes in oscillatory and nonlinear dynamic processes of microcirculation in patients with obliterating atherosclerosis of lower limb arteries after revascularization

Alexander P. Vasiliev, Nina N. Streltsova

Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111, Melnikaite str., Tyumen, 625026, Russian Federation

Abstract

Aim: To study the nature of changes in oscillatory and nonlinear dynamic processes in the skin microcirculatory system by laser Doppler flowmetry in patients with obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries (OALLA) after limb revascularization.

Material and Methods. 27 male patients with OALLA before and after endovascular revascularization of the affected limb (median age 63.0 [60.0; 69.0] years) were studied. Microcirculation (MC) of the foot skin with assessment of nonlinear dynamic processes and spectral wavelet analysis of blood flow fluctuations was studied by laser Doppler flowmetry. The normalized amplitude indices of blood flow fluctuations were determined in frequency ranges reflecting: endothelial, neurogenic, myogenic, respiratory, pulse factors of hemocirculation. Bypass parameters and nutritive blood flow were assessed. An occlusion test was performed to determine capillary blood flow reserve. The study of nonlinear dynamic processes included assessment of fractal dimension, entropy determination and phase portrait analysis.

Results. Limb revascularization in patients with OALLA resulted in improvement of the clinical picture accompanied by statistically significant increase in nutritive blood flow (+9.7%) and reserved dilatation potential of microvessels (+43.2%), decrease in arteriolo-venular blood shunting (–5.0%) and venous plethora (–14.3%). The analysis of nonlinear dynamic processes of the MC showed that after angioplasty, along with the remaining deficit of oscillatory processes energy, there was a decrease in the fractal dimension index (–14.3%), indicating the limitation of lability of the functional system of the microvascular bed. At the same time, an increase in the chaotization of the regulatory mechanisms of the peripheral blood flow was established.

Conclusions. The results showed positive functional changes of the MC system associated with the improved clinical picture in patients with OALLA after limb revascularization. At the same time, changes in the nonlinear dynamics parameters indicate a compensatory increase in the chaotization of the system together with the remaining limitation of its functional lability and the energy deficit of oscillatory processes.

Keywords:	obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries, microcirculation, laser Doppler flowmetry, nonlinear dynamics, limb revascularization.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the authors have no financial interest in the submitted materials or methods.
Adherence to ethical standards:	informed consent was obtained from each patient prior to the study. The study was approved by the Biometrics Ethics Committee of Tyumen Cardiology Research Centre (Protocol № 128, dated 21.02.2017).
For citation:	Vasiliev A.P., Streltsova N.N. Changes in oscillatory and nonlinear dynamic processes of microcirculation in patients with obliterating atherosclerosis of lower limb arteries after revascularization. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):75–81. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-75-81 .

Введение

Обладая широким спектром компенсаторно-адаптивных реакций, многоуровневым механизмом регуляции и представляя сложную динамическую систему, микроциркуляция (МЦ) является важным элементом поддержания гомеостаза. Поэтому получение информации о состоянии МЦ в медицине всегда было актуальным. Сегодня, с развитием технических возможностей, появилось немало неинвазивных методов исследования периферической гемодинамики, доступных для применения в условиях

клиники. Большую популярность приобрела лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), позволяющая неинвазивно оценить функциональное состояние различных звеньев микрососудистого русла (МСР). Применение современных методов исследования значительно расширило наши представления о МЦ процессах как в нормальных условиях, так и при различных патологических состояниях.

Следует однако подчеркнуть, что понятие о физиологических механизмах функционирования организма до недавнего времени базировалось исключительно на представлении о линейной динамике основных процес-

сов, заключающимся в том, что реакция функциональной системы на воздействие является простой суммой каждого из отдельных воздействий на нее. Другими словами, сигнал на выходе биологической системы пропорционален сигналу на входе [1]. Спектральные характеристики ЛДФ на основе преобразований Фурье [2] или вейвлет-анализа [3] продемонстрировали хорошую информативность при изучении МЦ. В то же время следует понимать, что живые системы имеют значительно более сложную природу, и теория линейной динамики в том виде, в каком она используется, не может верно описать некоторые биологические процессы [3].

В последние десятилетия интенсивно развивается и внедряется в медицину теория нелинейных систем, по которой результат, в силу воздействия на них многочисленных факторов, не пропорционален первопричине. Просто сумма частей не составляет целого. В природе практически все процессы имеют нелинейный характер, поскольку включают сложные связи между их структурно-функциональными элементами, что необходимо учитывать при их изучении. Нелинейные методы гораздо более подходят для анализа живых функциональных структур и дают более полное представление об особенностях их функционирования, чем линейные методы, традиционно используемые в медицине [5]. Они дают возможность оценить фундаментальные свойства физиологических процессов – энтропию, отражающую состояние информационной неопределенности, фрактальность, указывающую на степень самоподобия процесса. Так, применение нелинейно-динамического подхода продемонстрировало свою эффективность и позволило получить новую полезную информацию при анализе электрокардиограммы и сигналов электроэнцефалограммы [6–8].

Кровоток в МСР является детерминированным процессом, включающим колебательно-волновые компоненты, отражающие факт постоянного воздействия множества факторов внутренней и внешней среды, вследствие чего флуктуация перфузии регистрируется в виде сложных неперIODических осцилляций, для анализа которых могут применяться методы нелинейной динамики [1]. В условиях выраженной вариабельности МЦ картины получить более полное представление об особенностях ее функционирования, основываясь лишь на принципах линейной динамики, нельзя.

О перспективности развития данного направления свидетельствует тот факт, что в последние годы все чаще делаются попытки оценить особенности поведения МЦ как нелинейной динамической системы в различных областях медицины [9–12]. Следует отметить, однако, что подобные исследования весьма ограниченно представлены при изучении сердечно-сосудистой патологии.

Ранее [12] нами проведено исследование нелинейных динамических процессов МЦ у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОААНК). Было выявлено существенное нарушение ритмических модуляций микрокровотока и нелинейных процессов микрокровотока, характеризующихся снижением сложности ЛДФ-сигнала, уменьшением относительной энтропии, ограничением выраженности хаоса и депрессией компенсаторно-адаптивного потенциала как следствие упрощения механизмов функционирования МСР. На наш взгляд, представляет интерес установить особенности изменения МЦ, прежде всего параметров ее нелинейной динамики, при улучшении клинического состоя-

ния пациентов с синдромом перемежающейся хромоты (ПХ) после восстановления кровотока в пораженной конечности.

Цель исследования: изучить характер изменения колебательных и нелинейно-динамических процессов в микроциркуляторном русле кожи методом ЛДФ у больных ОААНК после реваскуляризации конечности.

Материал и методы

Исследование проводилось в Тюменском кардиологическом научном центре. В нем приняли участие 27 пациентов мужского пола (медианный возраст –63,0 [60,0; 69,0]) года с ОААНК, синдромом ПХ II Б стадии (по А.Б. Покровскому) и с лодыжечно-плечевым индексом (ЛПИ) $\leq 0,85$. Из исследования исключались пациенты с заболеваниями крови, бронхолегочной патологией, сахарным диабетом, сложными нарушениями ритма (фибрилляция предсердий, частая экстрасистолия) и сердечной недостаточностью выше II функционального класса (NYHA). У 25 (92,5%) пациентов выявлена артериальная гипертония, 19 (70,4%) страдали ишемической болезнью сердца, из них 6 (22,2%) в анамнезе имели перенесенный инфаркт миокарда. Все больные получали базовую терапию, включающую аспирин, статины и при необходимости гипотензивные препараты. За 3 сут до исследования препараты с сосудорасширяющим действием отменялись. На исходном этапе и спустя 1 мес. после баллонной ангиопластики со стентированием стенозированного сегмента артерии определяли ЛПИ и исследовали МЦ кожи тыльной поверхности стопы пораженной конечности методом ЛДФ на аппарате ЛАКК-М (НПП «Лазма», Россия). Исследовали показатель микроциркуляции (ПМ, перф. ед), указывающий на средний уровень перфузии в единице объема ткани за единицу времени. Методом вейвлет-анализа в различных частотных диапазонах оценивали амплитудные показатели, нормированные по среднеквадратичному отклонению колебаний перфузии, отражающие выраженность эндотелиального (Аэ/3 σ , ед), нейрогенного (Ан/3 σ , ед), миогенного (Ам/3 σ , ед), респиаторного (Ад/3 σ , ед) и пульсового (Ас/3 σ , ед) механизмов контроля МЦ. Расчетным способом определяли показатели шунтирования (ПШ, ед) и нутритивного кровотока (Мнутр, ед). Оценку резервов МСР (РКК, %) проводили с помощью окклюзионной пробы [3].

Наряду с ритмическими колебаниями кровотока осуществлялась количественная оценка параметров нелинейной динамики. Исследовались фрактальность, величина энтропии и состояние фазового портрета [3, 10]. Фрактальность («изломанность», нерегулярность) оценивается величиной фрактальной размерности. Она указывает на количество факторов, оказывающих влияние на МЦ, и дает представление о степени сложности исследуемой системы. Определение фрактальной размерности ЛДФ-грамм проводилось методом Хаусдорфа (D_0). Дополнительно использовался показатель Херста (R/S).

Энтропия (H_0) представляет собой количественную меру степени неопределенности системы, дает представление о «хаосе» в регуляции МЦ. Снижение этого показателя свидетельствует об уменьшении хаотичности в функционировании системы. H_1 – представляет собой величину энтропии, нормированную по отношению к относительной энергии МСР (E), сообщаемой эритроцитам при функционировании активных и пассивных факторов регуляции микрокровотока. Чем ниже показатель H_1 , тем

меньше вклад информационного компонента в величину H_0 . Изменение параметра E_0 связано с перераспределением энергетических затрат в процессе МЦ. Количественной оценкой фазового портрета, отражающего динамические связи систем, является корреляционная размерность (D_2). Нормирование ее по E_0 (D_2H) позволяет оценить хаотический компонент поведения системы в независимых от энергии условиях. Математический расчет всех количественных показателей нелинейной динамики выполнен с помощью программного обеспечения, приложенного к аппарату ЛАКК-М.

Результаты исследования обработаны с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS STATISTICS 26 (USA). Для проверки нормальности распределения количественных показателей применяли критерий Шапиро – Уилка. Так как распределение большинства показателей отличалось от нормального, для выявления статистически значимых различий этих показателей до и после восстановления кровотока в магистральной артерии нижней конечности использовали критерий Уилкоксона. Категориальные показатели описаны абсолютными и относительными (в %) частотами встречаемости. Количественные показатели представлены медианой и интерквартильным промежутком (Me [Q1; Q3]). Для оценки динамических связей показателей до и после реваскуляризации использовался коэффициент корреляции Спирмена, r . Пороговый уровень значимости при проверке статистических гипотез составлял $p = 0,05$.

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики, правилами Good Clinical Practice и принципами Хельсинкской декларация ВМА. Исследование одобрено комитетом по биометрической этике Тюменского кардиологического научного центра (протокол № 128 от 21.02.2017 г.). Все пациенты до начала исследования подписали информированное согласие.

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные на исходном этапе исследования и соответствующие ранее представленным данным [12], показали, что МЦ у пациентов с ОААНК отличалась выраженными функциональными нарушениями спастико-атонического характера и изменениями показателей нелинейной динамики, указывающими на упрощение структуры ЛДФ-сигнала и уменьшение хаотического компонента системы микрогемодинамики. Через 1 мес. после реваскуляризации конечности у всех пациентов наблюдался рост ЛПИ до нормальных значений, отмечалось прекращение болей в мышцах ног при ходьбе. Улучшение клинической картины сопровождалось позитивными сдвигами показателей МЦ (табл. 1). Частотно-амплитудный анализ ЛДФ-грамм продемонстрировал снижение амплитуды колебаний кровотока в нейрогенном частотном диапазоне ($An/3\sigma$) ($p = 0,044$), что свидетельствует об оптимизации регуляторной функции симпатической нервной системы на уровне артериол и артериоло-веноулярных анастомозов [13]. Подобные изменения, вероятно, связаны с ликвидацией тканевой ишемии после восстановления кровотока в конечности и восстановлением чувствительности нервных окончаний. Полученные данные указывают на обратимость некоторых ишемических патофизиологических процессов. Восстановление адекватной регуляторной функции МСР, в частности вазоконстрикторного контроля за микро-

судистым тонусом, находит отражение в статистически значимом уменьшении показателя артериоло-веноулярного шунтирования крови (ПШ). Ограничение шунтового кровотока сопровождается снижением венозного полнокровия, на что указывает депрессия амплитуды флуксуций в респираторном частотном диапазоне ($Ad/3\sigma$) ($p = 0,049$). Известно, что ослабление венозного застоя и увеличение скорости кровотока благоприятно сказывается на гемореологических свойствах, являясь важным фактором оптимизации микрокровотока [14, 15]. Ликвидация препятствия кровотоку в магистральной артерии сопровождалась ростом амплитуды колебаний пульсового кровенаполнения тканей ($Ac/3\sigma$). Итогом обнаруженных сдвигов в регуляции МЦ является рост капиллярного кровотока ($Mnutr$; $p = 0,035$) и увеличение дилатационного потенциала МСР (PKK ; $p = 0,025$).

Таким образом, восстановление кровотока в конечности у пациентов с ОААНК параллельно с улучшением клинической картины сопровождается устранением важных патофизиологических сдвигов на уровне МСР и создает условия для оптимизации его функционирования.

Таблица 1. Значения лодыжечно-плечевого индекса и показателей лазерной доплерографической флоуметрии у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей до и после восстановления кровотока в магистральной артерии нижней конечности

Table 1. Ankle-brachial index and laser Doppler flowmetry values in patients with obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries before and after restoration of blood flow in the main artery of the lower limb

Показатели Parameters	Пациенты с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей Patients with obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries $n = 27$		p
	Исходно At baseline	После реваскуляризации нижней конечности After endovascular revascularization	
ЛПИ, ед ABI, units	0,65 [0,58; 0,74]	0,96 [0,84; 1,03]	0,001
ПМ, перф. ед MC, perf. un.	7,1 [5,6; 9,6]	7,8 [5,4; 9,3]	0,98
Мнутр, ед NBF, units	3,1 [2,3; 4,2]	3,4 [2,9; 5,0]	0,035
РКК, % BFR, %	140,7 [126,2; 223,8]	201,5 [135,6; 252,5]	0,025
ПШ, ед ShV, units	2,0 [1,4; 3,4]	1,9 [1,1; 2,9]	0,017
$A\sigma/3\sigma$, ед $Ae/3\sigma$, units	15,7 [11,5; 17,8]	14,6 [10,5; 18,0]	0,72
$An/3\sigma$, ед $An/3\sigma$, units	17,6 [13,3; 21,5]	12,5 [11,4; 19,9]	0,044
$Am/3\sigma$, ед $Am/3\sigma$, units	8,2 [6,7; 13,9]	7,3 [5,8; 10,4]	0,27
$Ad/3\sigma$, ед $Ar/3\sigma$, units	6,3 [4,1; 10,8]	5,4 [3,2; 6,7]	0,049
$Ac/3\sigma$, ед $Ap/3\sigma$, units	5,0 [3,9; 7,2]	8,3 [38; 12,9]	0,041

Примечание: здесь и далее. $A\sigma/3\sigma$, $An/3\sigma$, $Am/3\sigma$, $Ar/3\sigma$, $Ac/3\sigma$ – амплитуды колебаний кровотока, нормированные по среднеквадратическому отклонению колебаний перфузии, ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс, Мнутр – уровень капиллярного кровотока, перф. ед – перфузионные единицы, ПМ – показатель микроциркуляции, ПШ – показатель шунтирования, РКК – резерв капиллярного кровотока.

Note: Hereinafter. $Ae/3\sigma$, $An/3\sigma$, $Am/3\sigma$, $Ar/3\sigma$, $Ap/3\sigma$ – amplitudes frequencies normalized by standard deviation of perfusion fluctuations, ABI – Ankle-brachial index, Mnutr – value of nutritive blood flow, perf. un. – perfusion units, IM – index of microcirculation, ShV – shunt indicator, BFR – blood flow reserve.

Обнаруженные особенности модификации спектра колебаний кровотока в МСР у пациентов с ОААНК сопровождались изменением ряда параметров нелинейной динамики. Следует отметить, что реваскуляризация стенозированной артерии не оказала влияния на состояние энергетического потенциала колебательного процесса (E_0), значения которого оставались сниженными по сравнению с установленной нормой [12] (табл. 2). Данный факт обусловлен сохранением суммарной доли участия активных, тонусформирующих факторов в регуляции микроциркуляции ($A\epsilon/3\sigma$, $A\eta/3\sigma$, $A\mu/3\sigma$) на прежнем уровне (77,8% до и 75,4% после ангиопластики магистральной артерии). Тенденция к уменьшению показателя E_0 , вероятно, связана со снижением вклада нейрогенных вазоактивных компонентов ($A\eta/3\sigma$) в гемоперфузию (см. табл. 1).

Таблица 2. Показатели нелинейной динамики у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей до и после эндоваскулярной реваскуляризации нижней конечности

Table 2. Indicators of nonlinear dynamics in patients with obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries before and after endovascular revascularization of the lower limb

Показатели Parameters	Пациенты с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей Patients with obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries, n = 27		p
	Исходно At baseline	После реваскуляризации нижней конечности After endovascular revascularization	
E_0	12,1 [8,6; 13,6]	10,7 [7,2; 13,1]	0,33
D_0	1,25 [1,20; 1,29]	1,07 [1,24; 1,40]	0,015
R/S	0,86 [0,60; 1,13]	0,87 [0,64; 1,16]	0,6
H_0	0,28 [0,25; 0,34]	0,32 [0,30; 0,34]	0,04
Hi	0,027 [0,023; 0,033]	0,029 [0,025; 0,039]	0,049
D_2	1,35 [1,24; 1,44]	1,33 [1,25; 1,47]	0,7
D_2H	0,12 [0,10; 0,14]	0,09 [0,05; 0,13]	0,003

Примечание: здесь и далее. D_0 – размерность Хаусдорфа, D_2 – корреляционная размерность, D_2H – корреляционная размерность, нормированная по энергии колебаний кровотока, H_0 – относительная энтропия, Hi – энтропия-информация, E_0 – относительная энергия, R/S – нормированный размах.

Note: hereinafter. D_0 - Hausdorff dimension, D_2 – correlation dimension, D_2H – correlation dimension normalized by the energy of blood flow oscillations, H_0 – relative entropy, Hi – entropy-information, E_0 – energy ratio, R/S – normalized range.

Анализ фрактальной размерности, дающий представление о количестве факторов, влияющих на систему, показал некоторое снижение параметра Хаусдорфа (D). Показатель Херста (R/S) не претерпел статистически значимых сдвигов, сохраняя низкие значения (< 1). В целом динамика параметров фрактальной размерности, свидетельствуя об уменьшении сложности регуляции МЦ у больных ОААНК, указывает на ограничение числа независимых факторов, участвующих в ее функционировании, и демонстрирует относительную устойчивость системы, ее ригидность, неготовность перейти в новое функциональное состояние [1, 9], несмотря на позитивный клинический эффект эндоваскулярного вмешательства. Отсутствие значимых сдвигов параметров фрактальной размерности объясняется, по-видимому, тем, что исследуемые лица представляют группу тяжелых больных с мультифокальным атеросклерозом, арте-

риальной гипертензией и дисфункцией эндотелия, что и находит отражение в данном случае в стабильно пониженных значениях показателей фрактальности. Опубликованы работы, в которых авторы доказывают, что для патологических состояний характерна потеря сложности организации функциональной системы, сопровождающаяся снижением объема адаптации [1, 9].

У пациентов с синдромом ПХ при повторном исследовании через 1 мес. после ангиопластики установлено повышение медианной величины относительной энтропии (H_0) на 14,3% ($p = 0,04$), которая дает представление о степени неопределенности, хаоса [3]. Рост активности хаотического поведения механизмов регуляции микроциркуляции демонстрирует также увеличение нормированных по E_0 показателей Hi-сигнала и D_2H -фазового портрета ($p = 0,049$ и $p = 0,03$ соответственно).

Об особенностях изменения механизмов контроля периодической гемодинамики дают представления результаты анализа корреляционных связей между величиной амплитуды колебаний кровотока в различных частотных диапазонах и некоторыми показателями нелинейной динамики до и после реваскуляризации пораженной конечности (табл. 3).

Таблица 3. Корреляционные связи показателей колебаний кровотока и показателей нелинейной динамики до и после реваскуляризации конечности

Table 3. Correlations between indicators of blood flow fluctuations and indicators of nonlinear dynamics before and after limb revascularization

Показатели Parameters		Aε/Aε	Aη/Aη	Aμ/Aμ	Aδ/Aδ	Aс/Aс
		H_0	Исходно At baseline	+0,79; $p = 0,001$	–	–
	1 мес. 1 month	+0,48; $p = 0,034$	+0,68; $p = 0,001$	–	+0,57; $p = 0,009$	–
Hi	Исходно At baseline	–	–0,52; $p = 0,018$	–0,64; $p = 0,002$	–0,54; $p = 0,014$	–
	1 мес. 1 month	–	–	–	–	–
D_2	Исходно At baseline	+0,79; $p = 0,001$	+0,62; $p = 0,001$	+0,60; $p = 0,001$	–	–
	1 мес. 1 month	+0,49; $p = 0,029$	–	–	–	+0,60; $p = 0,001$
D_2H	Исходно At baseline	–0,51; $p = 0,027$	–0,55; $p = 0,012$	–0,62; $p = 0,004$	–0,49; $p = 0,028$	–
	1 мес. 1 month	–	–	–	–	–

Примечание: здесь и далее. Aε, Aη, Aμ, Aδ, Aс – амплитуды колебаний кровотока.

Note: hereinafter. Aε, Aη, Aμ, Aδ, Aс – amplitudes frequencies blood flow

Обращает на себя внимание уменьшение количества ассоциаций между изучаемыми параметрами после эндоваскулярного вмешательства вдвое, что можно трактовать как проявление автономизации регуляторных процессов МЦ. Вместе с тем при повторном исследовании выявлено возникновение статистически значимых корреляционных связей амплитуды ритмических колебаний гемоперфузии ткани в различных частотных диапазонах

(Аэ, Ан, Ад) с величиной энтропии (H_0), отражающей степень хаотизации функционирования кровотока. Связь хаотического компонента в функционировании МСР наглядно демонстрируют корреляции между изменениями показателя D_2 фазового портрета (ΔD_2), отражающего неопределенность поведения системы, с изменениями амплитуд ритмических колебаний микрокровотока $\Delta A\Delta$, $\Delta A\Delta$, $\Delta A\Delta$, $\Delta A\Delta$ (рис. 1).

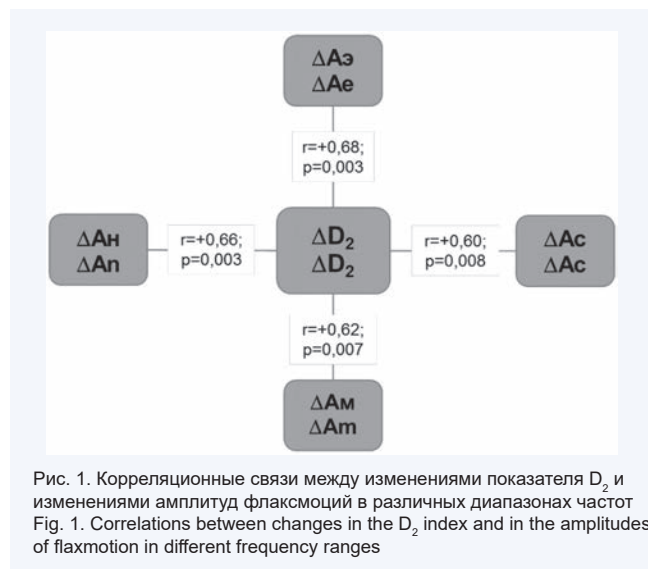


Рис. 1. Корреляционные связи между изменениями показателя D_2 и изменениями амплитуд флуксуций в различных диапазонах частот
Fig. 1. Correlations between changes in the D_2 index and in the amplitudes of flaxmotion in different frequency ranges

То есть увеличение хаотизации в МЦ процессах ассоциируется с оптимизацией микрокровотока и ростом гемоперфузии. Исходя из теории детерминированного хаоса, полагают, что хаос делает систему способной быстро переключать режимы функционирования, обеспечивая ее лабильность и устойчивость к внешним воздействиям в связи с повышением числа степеней свободы [16].

Следует подчеркнуть, что в настоящее время использование принципов нелинейной динамики с успехом находит все большее применение в медицине. Исследование аномалий сердечного ритма по параметрам фрактальности и энтропии позволило разработать и предло-

жить прогностические критерии [17, 18]. Так, например, установлено, что снижение хаотичности и фрактальной размерности сердечного ритма может быть ранним признаком развития фатальной фибрилляции желудочков у пациентов с сердечной недостаточностью [19].

Заключение

Полученные в настоящем исследовании результаты продемонстрировали, что улучшение клинического состояния больных ОААНК после эндоваскулярной реваскуляризации пораженной конечности сопровождалось позитивными сдвигами регуляторных механизмов периферического кровотока, характеризовавшимися снижением констрикции прекапиллярного сегмента МСР, ростом плотности капилляров, повышением резервного потенциала микрососудов, снижением венозного полнокровия.

Анализ поведения нелинейных динамических процессов МЦ показал, что при повторном исследовании, несмотря на оптимизацию патофизиологических сдвигов периферического кровотока, на фоне дефицита энергии потока крови сохранялись пониженные значения фрактальной размерности, свидетельствуя об ограничении количества факторов, влияющих на МЦ, делая ее более ригидной и функционально менее лабильной. Такая стабильность поведения системы, вероятно, обусловлена наличием эндотелиальной дисфункции у пациентов с системным атеросклерозом и артериальной гипертензией. Вместе с тем отмечено включение механизмов, повышающих хаотизацию регулярных процессов, которая дает безусловные преимущества, т. к. хаотические системы легко адаптируются к изменению условий функционирования.

Сегодня не вызывает сомнения тот факт, что изучение свойств нелинейной природы физиологических систем позволяет получить принципиально новую, дополнительно к классической, информацию. Анализ нелинейных процессов в медицине является перспективным, интенсивно развивающимся направлением. Однако в настоящее время существует ряд методических проблем, связанных с получением, описанием и интерпретацией параметров нелинейной динамики физиологических систем, что требует привлечения для их решения усилий математической науки.

Литература / References

- Бекман И.Н. Нелинейная динамика сложных систем: теория и практика. Метанаука. Эволюция систем. М.; 2018. [Beckman I.N. Nonlinear dynamics of complex systems: theory and practice. Metascience. The evolution of systems. Moscow; 2018. (In Russ.).]
- Bonato P., Roy S.H., Knaflitz M., De Luca C.J. Time-frequency parameters of the surface myoelectric signal for assessing muscle fatigue during cyclic dynamic contractions. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2001; 48(7):745–53. DOI: 10.1109/10.930899.
- Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность: рук-во для врачей. М.: Либроком; 2013:496. [Krupatkin A.I., Sidorov V.V. Functional diagnostics of mikrotsirkuljatorno-tissue systems: Fluctuations, information, nonlinearity. Guide for Physicians. Moscow: Librokom; 2013:496. (In Russ.).]
- Анищенко В.С. Знакомство с нелинейной динамикой. М.: Издательство ЛКИ; 2008:224. [Anishchenko V.S. Introduction to nonlinear dynamics. Moscow: LKI Publishing House; 2008:224. (In Russ.).]
- Klonowski W. From conformons to human brains: an informal overview of nonlinear dynamics and its applications in biomedicine. *Nonlinear Biomed. Phys.* 2007;1(1):5. DOI: 10.1186/1753-4631-1-5.
- Henriques T., Ribeiro M., Teixeira A., Castro L., Antunes L., Costa-Santos C. Nonlinear Methods Most Applied to Heart-Rate Time Series: A Review. *Entropy (Basel)*. 2020;22(3):309. DOI: 10.3390/e22030309.
- Ilarraza-Lomelí H., Rius-Suárez M.D. Complexus cordis. *Arch. Cardiol. Mex.* 2020;91(3):327–336. DOI: 10.24875/ACM.200000391.
- Ma Y., Shi W., Peng C.-K., Yang A.C. Nonlinear dynamical analysis of sleep electroencephalography using fractal and entropy approaches. *Sleep. Med. Rev.* 2018;37:85–93. DOI: 10.1016/j.smrv.2017.01.003.
- Зуева М.В. Нелинейные фракталы: приложения в физиологии и офтальмологии. Обзор. *Офтальмология*. 2014;1(1):4–11. [Zueva M.V. Nonlinear fractals: applications in physiology and ophthalmology. Zueva M.V. Nonlinear fractals: applications in physiology and ophthalmology. *Ophthalmology in Russia*. 2014; 11(1):4–11. (In Russ.).]
- Крупаткин А.И., Сидоров В.В., Кучерик А.О., Троицкий Д.П. Современные возможности анализа поведения микроциркуляции крови как нелинейной динамической системы. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. 2010;9(1):61–67. [Krupatkin A.I., Sidorov V.V., Kucherik A.O., Troitsky D.P. Modern possibilities to analyse the behavior of microhemocirculation as nonlinear dynamic system. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2010;9(1):61–67. (In Russ.).]
- Кожевникова К.В., Малюжинская Н.В., Полякова О.В. Анализ нелинейной динамики в микроциркуляторном русле у детей с сахарным диабетом типа 1 методом лазерной доплеровской флоуметрии.

- Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2016;58(2):127–131.
- [Kozhevnikova K.V., Malyuzhinskaya N.V., Polyakov O.V. Analysis of nonlinear dynamics in the microvasculature in children with type 1 diabetes by laser doppler flowmeter. *Journal of Volgograd state medical university*. 2016;58(2):127–131. (In Russ.)). URL: <https://www.volgmed.ru/uploads/journals/articles/1494054472-vestnik-2016-2-2700.pdf> (31.01.2023).
12. Стрельцова Н.Н., Васильев А.П. Особенности нелинейных динамических процессов и их взаимосвязь с показателями микроциркуляции у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей по данным лазерной доплеровской флоуметрии. *Лазерная медицина*. 2022;26(2):15–20. [Streltsova N.N., Vasiliev A.P. Non-linear dynamic processes and their correlation with indicators of microcirculation in patients with obliterating atherosclerosis of the lower extremities arteries according to laser doppler flowmeter. *Laser medicine*. 2022;26(2):15–20. (In Russ.)). DOI: 10.37895/2071-8004-2022-26-2-15-20.
 13. Schmid-Schönbein H., Ziege S., Grebe R., Blazek V., Spielmann R., Linzenich F. Synergetic interpretation of patterned vasomotor activity in microvascular perfusion: discrete effects of myogenic and neurogenic vasoconstriction as well as arterial and venous pressure fluctuations. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1997;17(6):346–59. DOI: 10.1159/000179251.
 14. Муравьев А.В., Михайлов П.В., Тихомирова И.А. Микроциркуляция и гемореология: точки взаимодействия. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. 2017;16(2):90–100. [Muravyov A.V., Mikhailov P.V., Tikhomirova I.A. Microcirculation and hemorheology: points of interaction. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2017;16(2):90–100. (In Russ.)). DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-2-90-100.
 15. Hamlin S.K., Benedik P.S. Basic concepts of hemorheology in microvascular hemodynamics. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 2014;26(3):337–44. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.04.005.
 16. Гольдберг Эри Л., Ригни Д.Р., Уэст Б.Д. Хаос и фракталы в физиологии человека. В мире науки. 1990;4:25–32. [Goldberg Eri L., Rigney D.R., West B.D. Chaos and fractals in human physiology. *In the world of science*. 1990;4:25–32. (In Russ.)).
 17. Isler V., Narin A., Ozer M., Perc M. Multi-stage classification of congestive heart failure based on short-term heart rate variability. *Chaos, Solitons & Fractals*. 2019;118:145–151. DOI: 10.1016/j.chaos.2018.11.020.
 18. Mondéjar-Guerra V., Novo J., Rouco J., Penedo M.G., Ortega M. Heart-beat classification fusing temporal and morphological information of ECGs via ensemble of classifiers. *Biomedical Signal Processing and Control*. 2019;47:41–48. DOI: 10.1016/j.bspc.2018.08.007.
 19. Skinner J.E., Pratt C.M., Vybiral T. A reduction in the correlation dimension of heartbeat intervals precedes imminent ventricular fibrillation in human subjects. *Am. Heart J.* 1993;125(3):731–743. DOI: 10.1016/0002-8703(93)90165-6.

Информация о вкладе авторов

Васильев А.П. – разработка концепции и дизайна исследования, выполнение интеллектуально значимой работы, анализ и интерпретация данных, написание текста и окончательное утверждение содержания статьи.

Стрельцова Н.Н. – участие в разработке концепции и дизайна исследования, получение данных и их статистический анализ, участие в интерпретации данных, оформление и редактирование статьи.

Информация об авторах

Васильев Александр Петрович, д-р мед. наук, главный научный сотрудник, отделение артериальной гипертонии и коронарной недостаточности, научный отдел клинической кардиологии, Тюменский кардиологический научный центр – филиал Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. ORCID 0000-0002-4931-5383.

E-mail: sss@infarkta.net.

Стрельцова Нина Николаевна, научный сотрудник, отделение артериальной гипертонии и коронарной недостаточности, научный отдел клинической кардиологии, Тюменский кардиологический научный центр филиал Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. ORCID 0000-0001-8675-9103.

E-mail: sss@infarkta.net.

 **Васильев Александр Петрович**, e-mail: sss@infarkta.net.

Information on author contributions

Vasiliev A.P. – development of the study concept and design, fulfilment of intellectually significant work, data analysis and interpretation, writing of the text and final approval of the content of the article

Streltsova N.N. – participation in the development of the study concept and design, data obtaining and statistical analysis, participation in the data interpretation, article design and editing.

Information about the authors

Alexander P. Vasiliev, Dr. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency Department, Scientific Department of Clinical Cardiology, Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-4931-5383.

E-mail: sss@infarkta.net.

Nina N. Streltsova, Scientific Research Scientist, Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency, Scientific Department of Clinical Cardiology, Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-8675-9103.

E-mail: sss@infarkta.net.

 **Alexander P. Vasiliev**, e-mail: sss@infarkta.net.

Received December 9, 2022

Поступила 09.12.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-82-89>
УДК 576.31.017.35:618.19-006.6-039.36-02

Морфологические особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации и ее влияние на опухолевую прогрессию рака молочной железы

Р.Б. Кондратюк¹, И.С. Греков¹, Д.С. Швороб¹, Е.А. Селезнёв²

¹ Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького, 283003, Донецкая Народная Республика, Донецк, пр. Ильича, 16

² Амвросиевская центральная районная больница, 283003, Донецкая Народная Республика, Амвросиевка, ул. Мичурина, 4

Аннотация

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре заболеваемости среди всех злокачественных новообразований у женщин. Прогноз течения заболевания зависит от степени опухолевой прогрессии, включающей в себя наличие эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ), степень инвазии, пролиферативный индекс, сохранение или отсутствие рецепторов к эстрогену, прогестерону и эпидермальному фактору роста.

Цель: исследование иммуногистохимической и морфологической характеристики эпителиально-мезенхимальной трансформации РМЖ.

Материал и методы. Иммуногистохимическое исследование с антителами к AE1/AE3, HMW, CK18, Snail, HER2/neu, E-cadherin, Vimentin, α -SMA, CD34, Ki-67 и p-53 проводилось в отношении 60 случаев РМЖ у пациенток разных возрастных категорий. Нативные препараты окрашивали пикрофуксином по ван Гизону альциановым синим. Клетки воспалительного инфильтрата исследовали к антителам CD45, CD3, CD4, CD8, CD20, CD68.

Результаты. В протоковом раке положительная экспрессия к эстрогену и прогестерону встречалась в 82,7 и 86,3% соответственно, индекс пролиферации составил до 66,6%, а p-53 был положителен в 97% случаев. В дольковом раке положительная экспрессия к эстрогену и прогестерону наблюдалась в 83,4 и 66,6% соответственно, индекс пролиферативной активности на уровне был 50%, а p-53 был положителен в 66,6% случаев. Положительная умеренная экспрессия HER-2/neu определялась в 47% протокового и 50% долькового рака. Эстроген играет важную роль в развитии инвазивной формы РМЖ, ведет к опухолевой прогрессии и способствует эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ). ЭМТ, в свою очередь, приводит к экспрессии E-cadherin, связанным с более худшим прогнозом выживаемости. ЭМТ опосредованно приводит к интенсификации ангиогенеза, а наличие большого количества новообразованных сосудов увеличивает риск метастазирования. Гистохимическими методами было определено разрастание волокнистой соединительной ткани вокруг инвазивно растущих комплексов рака. Клетки, располагающиеся перифокально, имели вид фибробластов, иммуногистохимически умеренно экспрессировали Vimentin и слабо – панцитокератин, что доказывало опухолевую природу клеток и приобретение ими мезенхимальных особенностей. Воспалительный инфильтрат по периферии опухолевого роста состоял преимущественно из Т- и В-лимфоцитов, а вокруг комплексов рака – из В-лимфоцитов и макрофагов.

Заключение. Исследование иммуногистохимического фенотипа опухоли позволит назначать адекватную полихимиотерапию и определить прогноз течения заболевания.

Ключевые слова:	рак молочной железы, эпителиально-мезенхимальная трансформация, иммуногистохимия.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Соответствие принципам этики:	информированное согласие получено от каждого пациента. Исследование одобрено этическим комитетом при ГОУ ВПО ДонНМУ им. М. Горького (протокол № 110 от 04.04.2021 г.)
Для цитирования:	Кондратюк Р.Б., Греков И.С., Швороб Д.С., Селезнёв Е.А. Морфологические особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации и ее влияние на опухолевую прогрессию рака молочной железы. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.</i> 2023;38(1):82–89. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-82-89 .

Morphological features of epithelial-mesenchymal transformation and its effect on tumor progression of breast cancer

Roman B. Kondratyuk¹, Ilya S. Grekov¹, Danil S. Shvorob¹, Evgenii A. Seleznev²

¹ Donetsk National Medical University named for M. Gorky, 16, Ilyich str., Donetsk, 283003, Donetsk People's Republic

² Amvrosievsky Central District Hospital, 4, Michurina str., Amvrosievka, 283003, Donetsk People's Republic

Abstract

Introduction. Breast cancer is in the first place in the structure of morbidity among all malignant neoplasms in women. The prognosis of the disease depends on the tumor degree, including the presence of epithelial-mesenchymal transformation (EMT), the degree of invasion, the proliferative index, the preservation or absence of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors.

Aim: To study the immunohistochemical and morphological characteristics of the epithelial-mesenchymal transformation of breast cancer.

Material and Methods. Immunohistochemical study with antibodies to AE1/AE3, HMW, CK18, Snail, HER2/neu, E-cadherin, Vimentin, α -SMA, CD34, Ki-67 and p63 was performed in 60 patients of different age with breast cancer. Native preparations were stained with picrofuchsin according to van Gieson Alcian blue. Inflammatory infiltrate cells were examined for antibodies CD45, CD3, CD4, CD8, CD20, CD68.

Results. In ductal carcinoma, positive expression for estrogen and progesterone was found in 82.7% and 86.3%, respectively, the proliferation index ranged before 66.6%, and p-53 was positive in 97%. In lobular cancer, positive expression to estrogen and progesterone was observed in 83.4% and 66.6%, respectively, the index of proliferative activity at the level of 50%, and p-53 was positive in 66.6%. Positive moderate expression of HER-2/neu was determined in 47% of ductal and 50% of lobular cancers. Estrogen plays an important role in the development of invasive breast cancer, leads to tumor progression and contributes to EMT. EMT, in turn, leads to the expression of E-cadherin associated with a worse survival prognosis. EMT indirectly leads to the intensification of angiogenesis, and the presence of a large number of newly formed vessels increases the risk of metastasis. Histochemical methods were used to determine the growth of fibrous tissue around invasively growing cancer complexes. Cells located perifocally looked like fibroblasts, immunohistochemically moderately expressed Vimentin and weakly expressed pancytokeratin, which proved the tumor nature of the cells and the acquisition of mesenchymal features by them. The inflammatory infiltrate along the periphery of the tumor growth consisted mainly of T- and B-lymphocytes, and around the cancer complexes - of B-lymphocytes and macrophages.

Conclusion. The study of the immunohistochemical tumor phenotype will make it possible to prescribe adequate polychemotherapy and determine the prognosis of the course of the disease.

Keywords:	breast cancer, epithelial-mesenchymal transformation, immunohistochemistry.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.
Adherence to ethical standards:	informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committee of M. Gorky Donetsk National Medical University (protocol No. 110 from 04.04.2021).
For citation:	Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Shvorob D.S., Seleznev E.A. Morphological features of epithelial-mesenchymal transformation and its effect on tumor progression of breast cancer. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):82–89. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-82-89 .

Введение

Как известно, рак молочной железы (РМЖ) по-прежнему занимает лидирующие позиции в общей смертности среди женского населения во всем мире. Зачастую опухоль молочной железы манифестирует в период постменопаузы, однако не исключено его развитие и у женщин молодого возраста. Огромное значение в развитии

и прогрессии новообразования играет эпителиально-мезенхимальная трансформация, характеризующаяся смешанной эпителиального фенотипа опухоли на мезенхимальный. Это во многом определяет особенности поведения опухолевых клеток, способность к метастазированию и приобретению ряда других, потенциально новых свойств. Поэтому определение ранних признаков такой трансдук-

ции является просто необходимым. Современная морфологическая диагностика опухолей требует не только верификации гистологического варианта и степени дифференцировки новообразования, но и обязательной оценки прогноза течения болезни, а также предполагаемого ответа на терапию, представление о которых можно получить с помощью иммуногистохимических методов исследования [1–3]. При РМЖ наиболее важными прогностическими показателями являются экспрессия рецепторов к эстрогенам и прогестерону, маркеру пролиферации Ki-67, p-53 и рецептору эпидермального фактора роста (HER2/neu).

Рецепторы эстрогена и прогестерона, относящиеся к группе стероидных рецепторов, играют решающую роль в нормальном развитии молочной железы и экспрессируются в наиболее распространенных подтипах злокачественных новообразований молочной железы. Именно наличие рецепторов к эстрогену в опухоли свидетельствует о ее потенциальной чувствительности к препаратам антиэстрогенового ряда, медикаментозной или хирургической кастрации. В свою очередь прогестероновые рецепторы являются первым необходимым звеном реакции клетки на прогестины и определяют ее чувствительность к соответствующим препаратам. Синтез прогестинов в клетках опухоли молочной железы индуцируется эстрогенами. Гормонозависимые опухоли молочной железы, содержащие один или оба типа рецепторов, имеют более благоприятное течение, послеоперационный прогноз, эффект гормонального лечения у них отмечается в 60–81% (два рецептора) и 41% наблюдений (один рецептор) [4–7].

Изучение Ki-67 (маркера пролиферации), экспрессирующегося во всех клетках, вышедших из G₀-фазы, представляется актуальным и позволяет определить именно «скрытый» пролиферативный потенциал данной опухоли, а также судить о степени ее злокачественности. Положительная реакция с маркером Ki-67 является достоверным прогностическим фактором для проведения более агрессивной лучевой и химиотерапии. Установлена корреляция между количеством клеток, экспрессирующих Ki-67, и степенью злокачественности опухоли, а также митотическим потенциалом [8, 9].

Чем выше в опухоли экспрессия мутантного типа p53 (протеин, «имитирующий» свойства природного p53, блокирующий апоптоз в опухоли), тем более агрессивное поведение свойственно для РМЖ: короткий безметастазный и безрецидивный период, худший прогноз и, следовательно, более «жесткая» терапия при выборе схемы лечения [10, 11].

Значимым фактором опухолевого роста, способным стимулировать рост как опухоли, так и стромы, является белок HER-2/neu [8, 9, 12]. Прогностическая ценность этого маркера заключается в следующем: при позитивном HER-2/neu-статусе пятилетняя выживаемость составляет 58%, при негативном – 77%; при наличии метастазов эти показатели составляют 31 и 61% соответственно. Также сверхэкспрессия HER-2/neu свидетельствует о резистентности опухоли к проводимой химиотерапии. Несомненно, весь диагностический спектр исследований напрямую зависит от формы, стадии и степени дифференцировки новообразования, однако своевременная и правильная диагностика поможет выбрать наиболее оптимальную стратегию лечения, что значительно улучшит прогноз и выживаемость таких больных.

Цель исследования: изучение иммуногистохимического статуса и морфологических характеристик эпителиально-мезенхимального перехода протокового и долькового форм РМЖ.

Материал и методы

Были обследованы 60 женщин с РМЖ в возрасте от 21 до 80 лет: из них на первый период зрелого возраста пришлось 2 женщины, на второй период – 44, на пожилой возраст – 26, старческий возраст – 2. При уточнении формы рака у 53 женщин выявлен протоковый РМЖ, у 7 – дольковый.

Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием моноклональных антител к панцитокератину AE1/AE3, высокомолекулярному цитокератину (HMW), цитокератину 18, который является прямой мишенью Snail, а также к рецептору эпидермального фактора роста HER2/neu (c-erb B2), E-кадгерину, виментину, альфа-гладкомышечному актину, Ki-67 (mib-1) и белка p-53 для оценки пролиферативной активности.

Срезы после парафиновой проводки окрашивали гематоксилином и эозином по ван Гизону, альциановым синим при pH 2,5 и при pH 1,0; иммуногистохимические методы исследования проводили с маркерами к эпителию (AE1/AE3, CK18, HMW), с маркером соединительной ткани (виментин), гладкомышечных волокон (α SMA) и десмин. Раково-ассоциированные фибробласты, располагающиеся в строме с альцианофилией при pH 2,5, обозначали как CAF I, миофибробласты с экспрессией α SMA и виментина как CAF II.

Качественный состав воспалительного и иммунноклеточного инфильтрата стромы оценивали с использованием маркеров к общему лейкоцитарному антигену CD45, T-лимфоцитам CD3, CD4, CD8, B-лимфоцитам CD20, макрофагам CD68.

Длину сосудистого русла опухоли определяли стереометрическим методом по Г.Г. Автандилову, подсчитывали число концов сосудов в срезе после иммуногистохимического мечения эндотелия сосудов с CD34. Более 20 концов в поле зрения при увеличении $\times 100$ оценивали как большое количество сосудов.

Гистологические препараты были изучены под светоптическим микроскопом Olympus BX-40, микрофотографирование произведено цифровой фотокамерой Olympus U-TV1X с программным обеспечением Olympus DP-Soft. Статистическая обработка результатов проводилась в пакете Medstat с применением базовых методов математической статистики. Статистический анализ показателей, полученных в результате обработки стабิโลграмм, показал, что их распределение отличается от нормального (критерий Шапиро – Уилка, $p < 0,001$). Для сравнения частот встречаемости в группах применялся χ^2 -критерий Пирсона.

Результаты и обсуждение

Проведена сравнительная оценка показателей иммуногистохимического статуса у больных РМЖ двух форм: протокового и долькового. Иммуногистохимически исследована экспрессия рецепторов к эстрогену и прогестерону, экспрессия белка HER2/neu (рецептора к эпидермальному фактору роста), Ki-67 (маркера пролиферации). Полученные результаты случаев протокового рака внесены в таблицу 1.

Таблица 1. Распределение случаев протокового рака молочной железы по наличию и частоте маркеров в опухолевых клетках**Table 1.** Distribution of cases of ductal breast cancer by the presence and frequency of markers in tumor cells

Маркеры Markers	Исследование не проводилось No research	Отрицательная Negative (0%)	Умеренно выраженная Moderate (1-20%)	Выраженная Severe (> 21%)	Количество исследований Number of researches
Рецепторы к эстрогену Estrogen receptors	1	9 (17,3%)	17 (32,7%)	26 (50%)	52 (100%)
Рецепторы к прогестерону Progesteron receptors	2	7 (13,7%)	20 (39,2%)	24 (47,1%)	51 (100%)
Ki – 67	22	–	23 (74,1%)	8 (25,9%)	31 (100%)
p-53	21	1 (3%)	22 (68,7%)	9 (28,3%)	32 (100%)

Таким образом, рецепторы к стероидным гормонам (эстрогену и прогестерону) не встречались в 17,3 и 13,7% случаев соответственно; умеренно выраженное содержание выявлено в 32,7 и 39,2% случаев, наибольшее количество наблюдений – с выраженным содержанием рецепторов: 50 и 47,1% соответственно.

Наиболее часто встречались случаи с умеренной выраженностью экспрессии индекса пролиферации и частоты p-53 протеина, 74,1 и 68,7% соответственно. Выявленная экспрессия наблюдалась в меньшем количестве

случаев – 25,9 и 28,3%. Индекс пролиферации был установлен во всех обследованных случаях, в 3% клеток протеин p-53 не был выявлен.

Для долькового рака, также как и для протокового, характерна высокая экспрессия рецепторов к стероидным гормонам, эстрогену и прогестерону – 50%. Умеренно выраженная экспрессия их определялась в 33,4 и 16,6% соответственно, не было выявлено ее в 16,6 и 33,4% случаев соответственно ($p < 0,01$); (для эстрогена Уэмп = 155,5; Укр = 64. Для прогестерона Уэмп = 141; Укр = 63), таблица 2.

Таблица 2. Распределение случаев долькового рака молочной железы по наличию и частоте маркеров в опухолевых клетках**Table 2.** Distribution of cases of lobular breast cancer by the presence and frequency of markers in tumor cells

Маркеры Marker	Исследование не проводилось No research	Отрицательная Negative (0%)	Умеренно выраженная Moderate (1-20%)	Выраженная Severe (> 21%)	Количество исследований Number of researches
Рецепторы к эстрогену Estrogen receptors	1	1 (16,6%)	2 (33,4%)	3 (50%)	6 (100%)
Рецепторы к прогестерону Progesteron receptors	1	2 (33,4%)	1 (16,6%)	3 (50%)	6 (100%)
Ki – 67	4	1 (33,4%)	2 (66,6%)	–	3 (100%)
p-53	4	1 (33,4%)	2 (66,6%)	–	3 (100%)

не наблюдалось случаев с высокой экспрессией индекса пролиферации Ki – 67 и p-53 протеина. Умеренно выраженная экспрессия составляла 66,6%, для обоих маркеров она не была выявлена в 33,4% случаев долькового рака ($p < 0,01$); Уэмп = 23, Укр менее 1.

В дольковом раке несколько реже (16,6%) по сравнению с протоковым встречается умеренная экспрессия рецепторов к прогестерону и чаще экспрессия была

отрицательной ($p < 0,01$). Среди обследованных клеток протокового и долькового рака выраженной экспрессии (+++) HER-2/neu рецепторов не выявлено, умеренная экспрессия (++) определялась в 47% случаев протокового рака и 50% долькового, низкая (+) – в 41,1% протокового и 50% долькового рака. Отрицательный результат выявлен в 11,9% случаев протокового рака ($p < 0,01$), таблица 3.

Таблица 3. Определение HER-2/neu рецепторов при различных формах рака молочной железы**Table 3.** Determination of HER-2/neu receptors in various forms of breast cancer

Формы рака Forms of cancer	Исследование не проводилось No research	Отрицательный Negative	+	++	+++	Количество исследований Number of researches
Протоковый Ductal	36	2 (11,9%)	7 (41,1%)	8 (47%)	–	17 (100%)
Дольковый Lobular	5	–	1 (50%)	1 (50%)	–	2 (100%)

Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) часто встречается в опухолях молочной железы. Экспрессия Snail1 и Snail2 (Slug) ведет к репрессии E-кадгерина, связанной с локальными или дистантными метастазами, рецидиву, снижению чувствительности к химиотерапии и плохому прогнозу.

Установлено, что эстрогены, играющие важную роль в развитии инвазивного протокового рака, не только ведут к опухолевой трансформации эпителиальных клеток РМЖ, но и способствуют ЭМТ в нем.

В эксперименте создана модель ингибиторного эффекта на опухолевый рост антагониста рецептора I к TGF- α , применение которого на РМЖ показало ингибцию роста опухоли. В опухолях большое значение в развитии и метастазировании имеет ангиогенез, который усилен в раках, особенно при ЭМТ. При быстром росте опухоли в ней создаются очаги гипоксии, которая индуцирует синтез HIF-1 α (гипоксией индуцированный фактор 1 α). В свою очередь HIF-1 α способствует экспрессии васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), вызывающего ангиогенез. Интенсивный ангиогенез может быть показанием к антиангиогенной терапии.

В исследуемом материале мы обнаруживали признаки ЭМТ при рутинной окраске гематоксилином и эозином, оценивали ее особенности при иммуногистохимических методах исследования, включая выраженность ангиогенеза. Так, в инвазивном протоковом раке с распространением его на жировую клетчатку (рис. 1) рядом с краем инвазии наблюдалось разрастание плотной волокнистой соединительной ткани, среди которой располагались разных размеров тяжи опухолевых клеток, нередко вытянутых, фибробластоподобных с заостренным краем (рис. 2); тяжи опухолевых клеток с заостренными концами их в крае инвазии среди фиброзной соединительной ткани, такие опухолевые клетки теряли экспрессию эпителиального маркера панцитокератина (рис. 3а). Отсутствие экспрессии цитокератина в крае тяжа опухолевых клеток среди фиброзной ткани сопровождалось приобретением экспрессии мезенхимального, соединительнотканного маркера виментина (рис. 3б). Интересно, что в опухоли много кровеносных сосудов, эндотелий которых экспрессирует виментин (рис. 4а) и меньше сосудов с экспрессией специфического для эндотелия маркера CD31 (рис. 4б).

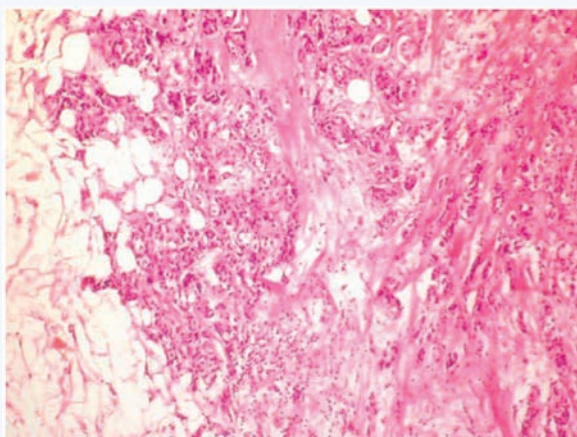


Рис. 1. Инвазивный протоковый рак с распространением на жировую клетчатку. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$
Fig. 1. Invasive ductal carcinoma with spread to fatty tissue. H&E stain, $\times 100$

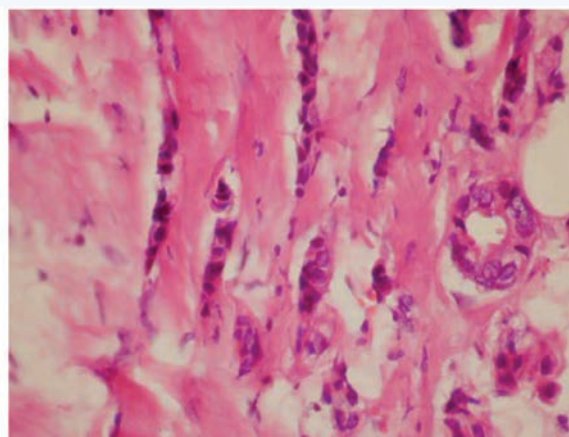


Рис. 2. Тяжи опухолевых клеток разных размеров, нередко вытянутых, фибробластоподобных с заостренным краем. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$
Fig. 2. Strands of tumor cells of different sizes, often elongated, fibroblast-like with a pointed edge, H&E stain, $\times 400$

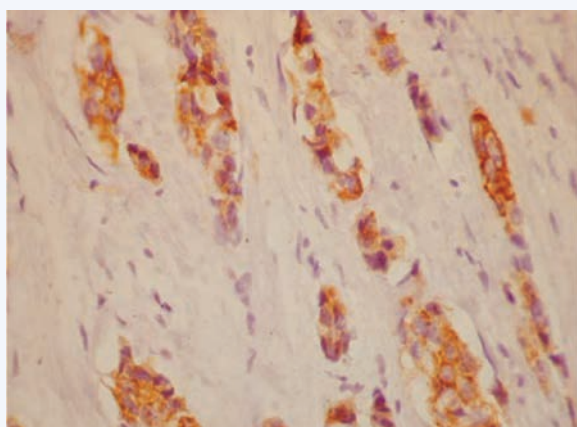


Рис. 3а. Опухолевые клетки с потерей экспрессии эпителиального маркера панцитокератина AE1/AE3, $\times 400$
Fig. 3а. Tumor cells with loss of expression of the epithelial marker pancytokeratin AE1/AE3, $\times 400$

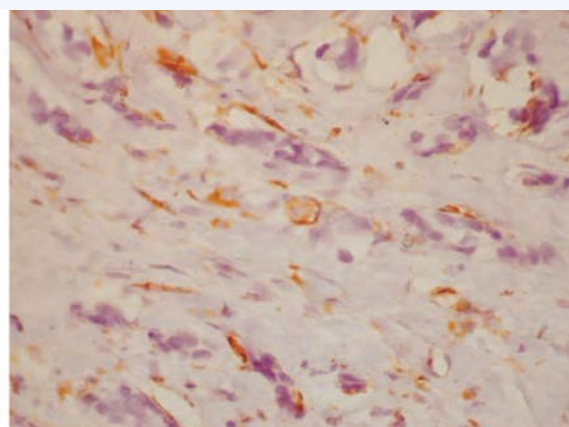


Рис. 3б. Приобретение вытянутыми опухолевыми клетками экспрессии мезенхимального, соединительнотканного маркера виментина, $\times 400$
Fig. 3б. Acquisition by elongated tumor cells of the expression of the mesenchymal, connective tissue marker vimentin, $\times 400$

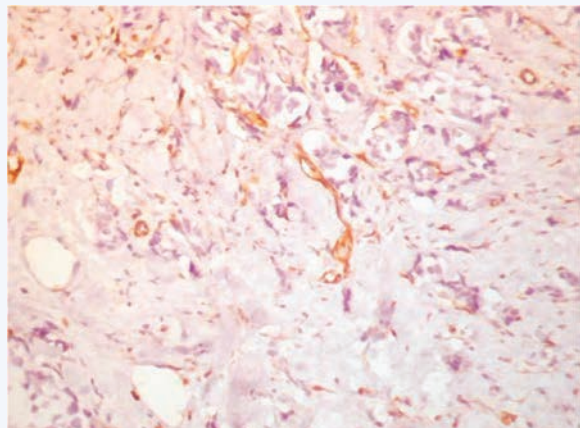


Рис. 4а. Большое число резко полиморфных тонкостенных кровеносных сосудов в опухоли, экспрессирующих виментин, ×200

Fig. 4a. A large number of sharply polymorphic thin-walled blood vessels in the tumor expressing vimentin, ×200

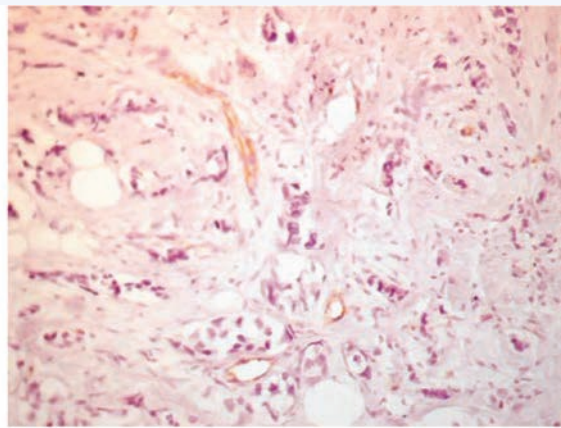


Рис. 4б. Меньшее количество кровеносных тонкостенных сосудов с экспрессией специфического для эндотелия маркера CD31, ×200

Fig. 4b. Fewer thin-walled blood vessels expressing endothelial-specific marker CD31, ×200

Иммуногистохимическое исследование позволяет оценить качественный состав иммуноклеточного инфильтрата в опухоли, его локализацию и выраженность. По периферии опухоли, на ее границе была выражена инфильтрация Т-лимфоцитами (рис. 5а). Их было меньше среди опухолевых клеток (рис. 5б). Также густой крупный инфильтрат на границе опухоли образовывали В-лимфоциты (рис. 5с), В-лимфоциты обнаруживались и в строме рядом с опухолевыми железами (рис. 5d). В строме среди опухолевых желез располагались и CD68 – положительные макрофаги (рис. 5е).

Обычно для ЭМТ в раках многих локализаций характерна активированная строма с большим количеством миофибробластов, экспрессирующих альфа-гладкомышечный актин. В этом случае он не обнаруживался в строме между опухолевыми клетками, был только в стенке сосуда (рис. 6). Вероятно, это связано с далеко зашедшей стадией образования и созревания стромы, когда между опухолевыми железами виден уже гиалиноз коллагеновых волокон (рис. 7). В зоне инвазии строма более молодая, активированная, с наличием сульфатированных гликозаминогликанов (рис. 8).

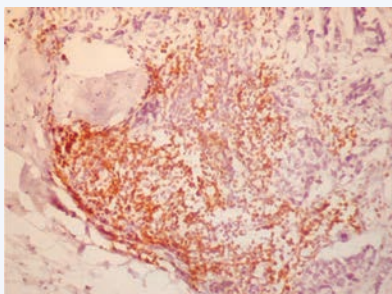


Рис. 5а. Выраженная инфильтрация CD3+ Т-лимфоцитами на периферии опухоли, ее границе, ×200

Fig. 5a. Severe infiltration of CD3+ T-lymphocytes on the periphery of the tumor, its border, ×200

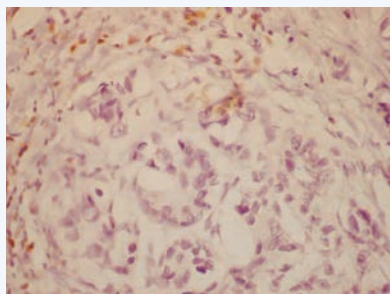


Рис. 5б. Единичные рассеянные CD3+ Т-лимфоциты среди опухолевых клеток, ×400

Fig. 5b. Single scattered CD3+ T-lymphocytes among tumor cells, ×400

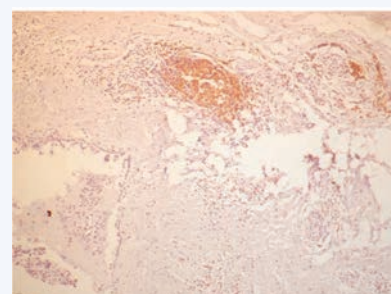


Рис. 5с. CD20+ В-лимфоциты в инфильтрате на границе с опухолевыми клетками, ×100

Fig. 5c. CD20+ B-lymphocytes in the infiltrate at the border with tumor cells, ×100

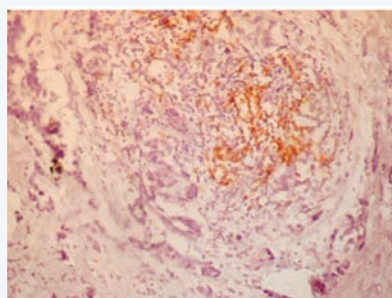


Рис. 5d. CD20+ В-лимфоциты в строме рядом с опухолевыми железами, ×200

Fig. 5d. CD20+ B-lymphocytes in the stroma next to the tumor glands, ×200

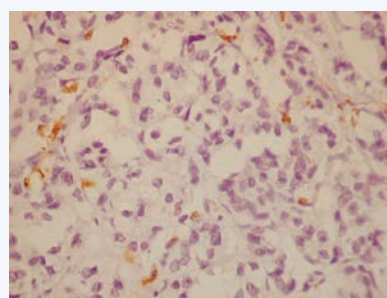


Рис. 5е. CD68+ макрофаги в строме среди опухолевых желез, ×400

Fig. 5e. CD68+ macrophages in the stroma among tumor glands, ×400

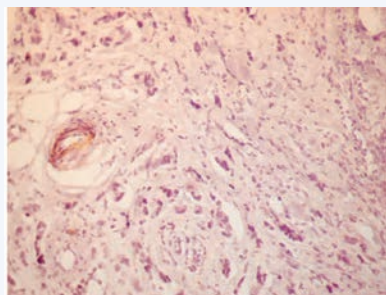


Рис. 6. aSMA экспрессирован только в стенке сосуда, отсутствует в фиброзной строме между опухолевыми клетками, ×200

Fig. 6. aSMA is expressed only in the vessel wall, absent in the fibrous stroma between tumor cells, ×200

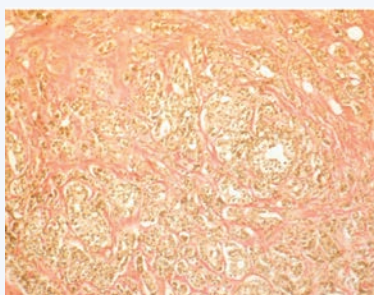


Рис. 7. Наличие гиалиноза коллагеновых волокон между очагами опухоли, тонкие волокна коллагена внутри этих очагов. Окраска по Ван Гизону, ×200

Fig. 7. The presence of hyalinosis of collagen fibers between tumor foci, thin collagen fibers inside these foci. Van Gieson stain, ×200

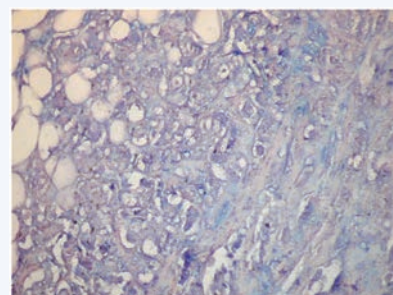


Рис. 8. Сульфатированные гликозаминогликаны в строме опухоли и секрет в просвете опухолевых желез. Окраска альциановым синим при pH 1,0; ×200

Fig. 8. Sulfated glycosaminoglycans in the tumor stroma and secretion in the lumen of the tumor glands. Alcian blue staining at pH1.0, ×200

По данным литературы, имеются отдельные признаки ЭМТ в РМЖ, например, потеря Е-кадгерина обнаруживается в дольковых раках, приобретение экспрессии виментина наблюдается в так называемом базалоидном раке (из миоэпителия базального слоя желез), но эти признаки не сопоставлялись друг с другом и особенностями ЭМТ.

Выводы

Исследованный и определенный иммуногистохимический статус больных позволит назначить адекватную полихимиотерапию и определить прогноз течения заболевания.

Литература / References

- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y.J., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871–890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Кокорев А.В., Могилёва А.С., Пюрвеев С.С., Лебеденко Е.А., Некрасов М.С. Эпителиально мезенхимальный переход и его роль в процессах метастазирования. *Forcipe*. 2020;3(1):173–174. [Kokorev A.V., Moguileva A.S., Puirveev S.S., Lebedenko E.A., Nekrasov M.S. Epithelial-mesenchymal transition and its role in metastasis processes. *Forcipe*. 2020;3(1):173–174. (In Russ.)].
- Cumin C., Huang Y.L., Everest-Dass A., Jacob F. Deciphering the importance of glycosphingolipids on cellular and molecular mechanisms associated with epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Biomolecules*. 2021;11(1):62. DOI: 10.3390/biom11010062.
- Nieto M.A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2011;27:347–376. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154036.
- Гапонова А.В., Родин С., Мазина А.А., Волчков П.В. Эпителиально-мезенхимальный переход: злокачественная прогрессия и перспективы противоопухолевой терапии. *Acta Naturae*. 2020;12;3:4–23. [Gaponova A.V., Rodin S., Mazina A.A., Volchkov P.V. Epithelial-mesenchymal transition: Role in cancer progression and the perspectives of antitumor treatment. *Acta Naturae*. 2020;12;3:4–23. (In Russ.)]. DOI: 10.32607/actanaturae.11010.
- Abaurrea A., Araujo A.M., Caffarel M.M. The role of the IL-6 cytokine family in epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(15):8334. DOI: 10.3390/ijms22158334.
- Chou M.Y., Yang M.H. Interplay of immunometabolism and epithelial-mesenchymal transition in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;13;22(18):9878. DOI: 10.3390/ijms22189878.
- Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J. Biochem*. 2018;164(4):257–264. DOI: 10.1093/jb/mvy047.
- Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Особенности экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода Е-кадгерина и виментина при разных иммуногистохимических вариантах карциномы молочной железы. *Уральский медицинский журнал*. 2014;116(2):29–32. [Zasadkevich Yu.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and vimentin in different immunohistochemical variants of breast carcinoma. *Ural Medical Journal*. 2014;116(2):29–32. (In Russ.)].
- Radisky D.C. Epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci*. 2005;118(19):4325–4326. DOI: 10.1242/jcs.02552.
- Кондратьюк Р.Б., Греков И.С., Ярков А.М., Русина А.А., Швороб Д.С. Роль эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации (часть 1). *Новообразование*. 2021;13(2):91–95. [Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M., Rusina A.A., Shvorob D.S. The role of epithelial-mesenchymal transition in carcinomas by different localizations (Part 1). *Neoplasia*. 2021;13(2):91–95. (In Russ.)].
- Ramesh V., Brabletz T., Ceppi P. Targeting EMT in cancer with repurposed metabolic inhibitors. *Trends Cancer*. 2020;6(11):942–950. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.06.005.

Информация о вкладе авторов

Кондратьюк Р.Б., Греков И.С., Швороб Д.С., Селезнев Е.А. – концепция и дизайн исследования.

Греков И.С., Швороб Д.С., Селезнев Е.А. – сбор и обработка материала.

Греков И.С. – написание текста.

Кондратьюк Р.Б. – редактирование.

Information on author contributions

Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Shvorob D.S., Seleznev E.A. – study concept and design.

Grekov I.S., Shvorob D.S., Seleznev E.A. – data collection and analysis.

Grekov I.S. – writing the manuscript.

Kondratyuk R.B. – manuscript editing.

Сведения об авторах

Кондратюк Роман Борисович, канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии, Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького. ORCID 0000-0001-5928-8799.
E-mail: rbkondrat@gmail.com.

Греков Илья Сергеевич, ассистент кафедры патологической анатомии, Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького; врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ДОКТМО. ORCID 0000-0002-6140-5760.
E-mail: ilya.grekov.1998@gmail.com.

Швороб Данил Сергеевич, ассистент кафедры патологической анатомии, Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького; врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ДОКТМО. ORCID 0000-0001-6578-0050.
E-mail: mcshady@mail.ru.

Селезнёв Евгений Александрович, врач-рентгенолог рентгенологического отделения, Амвросиевская центральная районная больница. ORCID 0000-0002-2413-8843.
E-mail: evgen.seleznyov@yandex.ru.

 **Греков Илья Сергеевич**, e-mail: ilya.grekov.1998@gmail.com.

Поступила 20.06.2022

Information about the authors

Roman B. Kondratyuk, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Pathological Anatomy Department, Donetsk National Medical named for M.Gorky. ORCID 0000-0001-5928-8799.
E-mail: rbkondrat@gmail.com.

Ilya S. Grekov, Assistant Professor, Department of Pathological Anatomy, Donetsk National Medical University named for M. Gorky, pathologist. ORCID 0000-0002-6140-5760.
E-mail: ilya.grekov.1998@gmail.com.

Danil S. Shvorob, Resident, Pathological Anatomy Department, Donetsk Clinical Territorial Medical Association. ORCID 0000-0001-6578-0050.
E-mail: mcshady@mail.ru.

Evgenii A. Seleznev, Radiologist, Radiological Department, Amvrosievsky Central District Hospital. ORCID 0000-0002-2413-8843.
E-mail: evgen.seleznyov@yandex.ru.

 **Ilya S. Grekov**, e-mail: ilya.grekov.1998@gmail.com.

Received June 20, 2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-90-98>
УДК 611.127:616.127-092.9]-06:613.25.038

Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на возрастные изменения миокарда у крыс

С.В. Логвинов^{1,2}, Л.Р. Мустафина¹, Б.К. Курбатов², М.А. Сиротина²,
С.А. Горбунов², Н.В. Нарыжная²

¹ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Связанный с долголетием рост сердечно-сосудистых заболеваний и метаболических нарушений актуализирует исследование влияния высококалорийных диет на старение сердца.

Цель исследования: экспериментальное изучение влияния высокоуглеводной высокожировой диеты (ВУВЖД) на миокард в молодом и старческом возрасте.

Материал и методы. Проведено морфологическое исследование миокарда в четырех группах крыс-самцов линии Вистар: группа 1 – 150-дневные животные, содержащиеся на стандартном рационе; группа 2 – 150-дневные крысы, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 60-дневного возраста); группа 3 – 540-дневные животные, содержащиеся на стандартном рационе; группа 4 – 540-дневные крысы, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 450-дневного возраста). Иммуноферментным методом в сыворотке крови определяли концентрацию фибронектина, трансформирующего фактора роста (ТФР) бета-1, фактора роста соединительной ткани (ФРСТ).

Результаты. В группах 2–4 выявлены лейкоцитозы, очаговая лимфо-моноцитарная инфильтрация стромы миокарда, увеличение количества кардиомиоцитов с кариопикнозом и отеком перинуклеарной зоны саркоплазмы, контрактурными нарушениями, увеличение удельного объема соединительной ткани стромы. Поражение кардиомиоцитов и фиброз были наиболее выражены в группе 4. ВУВЖД повышала концентрацию фибронектина как у молодых, так и у старых животных с преобладанием в группе 4, вызывала тенденцию к повышению содержания ТФРбета-1, ФРСТ в сыворотке крови. Таким образом, ВУВЖД ускоряет и усиливает возрастные изменения миокарда белых крыс.

Ключевые слова:	возрастные изменения миокарда, высокоуглеводная высокожировая диета, контрактурные изменения кардиомиоцитов, фибронектин, трансформирующий фактор роста бета-1, фактор роста соединительной ткани.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование изменений миокарда у молодых крыс при индуцированном метаболическом синдроме проводилось при поддержке Российского научного фонда Грант https://rscf.ru/project/22-25-20001/ и средств Администрации Томской области. Исследование изменений миокарда у старых крыс при индуцированном метаболическом синдроме осуществлялось в рамках государственного задания 122020300042-4. Работа выполнена с использованием Центра коллективного пользования «Медицинская геномика».
Соответствие принципам этики:	исследование одобрено этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 201 от 30.07.2020 г.).
Для цитирования:	Логвинов С.В., Мустафина Л.Р., Курбатов Б.К., Сиротина М.А., Горбунов С.А., Нарыжная Н.В. Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на возрастные изменения миокарда у крыс. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):90–98. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-90-98 .

✉ Мустафина Лилия Рамильевна, Irmustafina@yandex.ru.

Influence of a high-carbohydrate high-fat diet on age-related changes in the myocardium in rats

Sergey V. Logvinov^{1,2}, Liliia R. Mustafina¹, Boris K. Kurbatov², Maria A. Sirotina², Alexander S. Gorbunov², Natalia V. Naryzhnaya²

¹ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Abstract

The increase in cardiovascular diseases and metabolic disorders associated with longevity actualizes the study of the effect of high-calorie diets on heart aging.

Aim: the experimental study of the effect of a high-carbohydrate high-fat diet on the myocardium in young and old age.

Material and Methods. A morphological study of the myocardium was carried out in four groups of male Wistar rats: group 1 - 150-day-old animals were kept on a standard diet; 2nd - 150 days, kept at a high-carbohydrate high-fat diet (HCHFD) for 90 days (from 60 days of age); 3rd - 540 days old, kept on a standard diet; 4th - 540 days old, kept at HCHFD for 90 days (from 450 days of age). ELISA method in blood serum was used to determine the concentration of fibronectin, transforming growth factor beta-1, connective tissue growth factor.

Results. In groups 2–4, leukostasis, focal lympho-monocytic infiltration of the myocardial stroma, an increase in the number of myocardial cells with karyopyknosis and edema of the perinuclear zone of the sarcoplasm, contracture disorders, and an increase in the specific volume of the connective tissue of the stroma were detected. The defeat of myocardial cells and fibrosis were most pronounced in group 4. HCHFD increased the concentration of fibronectin in animals in both age groups with predominance in group 4, caused a tendency to increase the content of transforming growth factor beta-1, connective tissue growth factor in blood serum. Thus, HCHFD accelerates and enhances age-related changes in the white rat myocardium.

Keywords:	age-related changes of myocardium, high-carbohydrate high-fat diet, contracture changes in myocardial cells, fibronectin, TGF-beta 1, CTGF.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	the study of myocardial changes in young rats with induced metabolic syndrome was supported by the Russian Science Foundation Grant https://rscf.ru/project/22-25-20001/ and funds from the Administration of the Tomsk Region. Studies of myocardial changes in old rats with induced metabolic syndrome were carried out within the framework of the state task 122020300042-4. The work was performed using the Center for Collective Use "Medical Genomics".
Adherence for ethical standards:	compliance with ethical principles. The study was approved by the local ethical committee of the Research Institute of Cardiology, Tomsk NIMTs (Protocol No. 201 dated July 30, 2020).
For citation:	Logvinov S.V., Mustafina L.R., Kurbatov B.K., Sirotina M.A., Gorbunov A.S., Naryzhnaya N.V. Influence of a high-carbohydrate high-fat diet on age-related changes in the myocardium in rats. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):90–98. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-90-98 .

Введение

Увеличение продолжительности жизни людей приводит к росту сердечно-сосудистых заболеваний и метаболических нарушений, связанных со старением [1]. Повышение во всем мире числа больных с метаболическим синдромом, являющимся предиктором болезней сердца, стимулировало проведение экспериментального исследования данной патологии и разработку ее диетических моделей, максимально приближенных к пищевым погрешностям у человека [2, 3]. Однако влияние высококалорийных диет на развитие возрастных нарушений сердца, структурные основы сердечной патологии, вызванной высокоуглеводной высокожировой диетой (ВУВЖД), в различных возрастных группах еще далеки от исчерпывающего понимания. Знания о взаимодействии двух патогенетических факторов – старения и ВУВЖД – необходимы

для разработки профилактики и лечения возрастных диабетических кардиомиопатий.

Цель настоящей работы: экспериментальное изучение влияния ВУВЖД на миокард в молодом и старческом возрасте.

Материал и методы

Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 60 и 450 дней. Все процедуры соответствовали Директиве Европейского парламента 2010/63/EU и заявлению FASEB о принципах использования животных в исследованиях и образовании. Экспериментальные группы формировали следующим образом: группа 1 ($n = 14$) – интактные 150-дневные (5-месячные) крысы, содержавшиеся на стандартном рационе в течение 90 сут (с 60-дневного возраста); группа 2 ($n = 14$) –

150-дневные крысы, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 60-дневного возраста); группа 3 ($n = 14$) – интактные 540-дневные (18-месячные) крысы, содержащиеся на стандартном рационе в течение 90 сут (с 450-дневного возраста); группа 4 ($n = 14$) – 540-дневные крысы, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 450-дневного возраста). ВУВЖД включала 16% белков, 21% жиров, 46% углеводов, в том числе 17% фруктозы, 0,125% холестерина. Вода была заменена 20%-м раствором фруктозы. Крысам групп 1 и 3 (интактным животным) давали стандартный корм для грызунов (белки – 24%, жиры 6%, углеводы – 44%) и чистую воду *ad libitum*. Из эксперимента животных выводили путем декапитации с предварительной анестезией хлоралозой (100 мг/кг внутривенно). Перед декапитацией забирали образцы крови, которые центрифугировали (15 мин 3000 об/мин), образцы сыворотки хранили в морозильной камере при -70°C . Иммуноферментным методом в сыворотке крови определяли концентрацию фибронектина (rat ab108850, Abcam), трансформирующего фактора роста (ТФР) бета-1 (transforming growth factor beta-1, TGF β -1) (rat ab119558, Abcam), фактора роста соединительной ткани (ФРСТ) (connective tissue growth factor, CTGF) (rat SEA010Ra Cloud-Clone). Образцы измеряли с помощью микропланшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan GmbH, Австрия). Для гистологического исследования стенку сердца разрезали на кусочки толщиной 2–3 мм, фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина в течение 24 ч, промывали в проточной воде и обезживали в растворе для гистологической обработки на основе абсолютизированного изопропилового спирта Изопреп (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург). После обезживания образцы миокарда заливали в гомогенизованную парафиновую среду для заливки BioPlast («BioOptica», Италия). Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, полученные при помощи ротационного механического микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизону, используя красители ООО «БиоВитрум» (Санкт-Петербург). Окрашенные препараты заключали в синтетическую монтирующую среду BioMount («BioOptica», Италия) и изучали под световым микроскопом Axio Lab.A1 («Carl Zeiss», Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с

помощью фотокамеры AxioCam 105 color («Carl Zeiss», Германия). В миокарде левого желудочка подсчитывали среднее содержание в поле зрения микроскопа кардиомиоцитов с кариопикнозом, перинуклеарным отеком саркоплазмы, контрактурными изменениями, а также содержание неизмененных кардиомиоцитов. Подсчет кардиомиоцитов производили в 10 независимых полях зрения срезов миокарда левого желудочка каждого сердца при увеличении 400 крат, площадь поля зрения составила 0,785 мм². С помощью окулярной сетки Автандилова определяли удельные объемы (%) соединительной ткани стромы миокарда, окрашенной по Ван Гизону.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., США). Полученные данные прошли проверку на согласие распределения с нормальным законом с помощью критерия Шапиро – Уилка. Данные, не соответствовавшие нормальному распределению, представляли в виде медианы и квартилей ($Me (Q_1-Q_3)$). Проверку на гомогенность дисперсий производили с использованием критерия Левене. Статистическую значимость различий показателей в группах при апостериорных сравнениях оценивали по критерию Манна – Уитни с поправками Бонферрони. Исходное пороговое значение значимости p было принято равным 0,05; с учетом поправки Бонферрони пороговый уровень значимости различий показателей в каждом из 6 апостериорных парных сравнений групп составил 0,0127.

Результаты

В сердцах крыс группы 1 (рис. 1А) зарегистрировано обычное строение подавляющего большинства кардиомиоцитов, соединительнотканной стромы, сосудов миокарда, а также эпикарда и эндокарда. У крыс группы 2 миокард характеризовался лейкостазами в просвете части венул (рис. 1Б), очагами инфильтрации стромы клетками преимущественно лимфоцитарно-моноцитарного ряда (рис. 1В). Имели место очаги пролиферации соединительной ткани между мышечными волокнами различной величины, иногда довольно обширные. Небольшая доля кардиомиоцитов была подвержена деструктивным изменениям в виде гомогенизации саркоплазмы, кариопикноза и дистопии ядер (рис. 1Г).

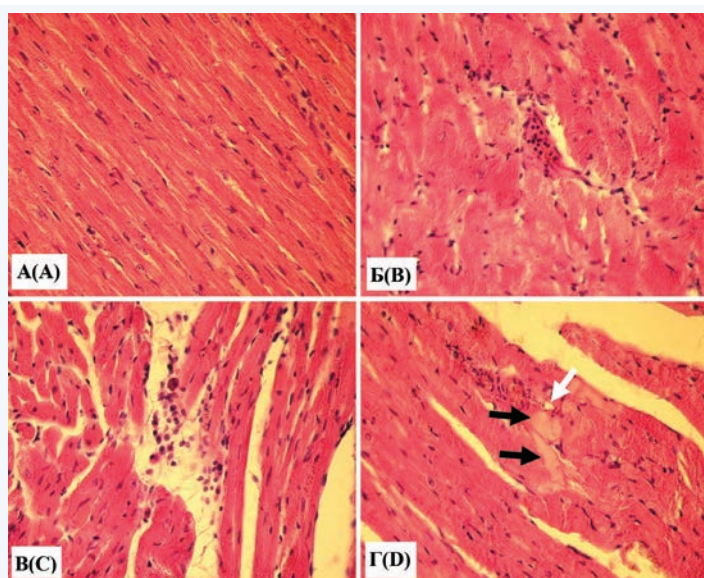


Рис. 1. Гистологические изменения сердца, связанные с высокоуглеводной высокожировой диетой, у 5-месячных крыс: А – обычное строение миокарда, группа 1; Б – лейкостаз в венуле миокарда (стрелка), группа 2; В – инфильтрация стромы миокарда клетками лимфо-моноцитарного ряда (стрелка), группа 2; Г – однородное гипохромное окрашивание саркоплазмы кардиомиоцитов (черная стрелка), кариопикноз (белая стрелка), группа 2. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$
Fig. 1. Histological changes in the heart associated with HCHF in 5-month-old rats: A – normal structure of the myocardium, group 1; B – leukostasis in myocardial venule (arrow), group 2; C – infiltration of the myocardial stroma by cells of the lympho-monocytic series (arrow), group 2; D – homogeneous hypochromic staining of myocardial cells sarcoplasm (black arrow), karyopyknosis (white arrow), group 2. Staining with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 400$

В миокарде животных группы 3 обнаруживалось разрастание коллагеновых волокон между кардиомиоцитами и в периваскулярных областях, но указанные изменения носили очаговый характер (рис. 2А).

Особенно заметна пролиферация соединительнотканых клеток, среди которых весьма часто выявлялись моноциты, макрофаги, фибробласты и лимфоциты (рис. 2Б). Стенка артерий и вен была утолщена в основном за счет адвентиции, часть гладких миоцитов средней оболочки вакуолизирована. Нередкой находкой являлись стаз и сладж эритроцитов в сосудах микроциркулятор-

ного русла. Перикард имел очаговые утолщения за счет пролиферации соединительной ткани, что сопровождалось инфильтрацией его лимфоцитами и клетками моноцитарно-макрофагального ряда (рис. 2В). Значительная доля кардиомиоцитов была подвержена деструктивным нарушениям в виде кариопикноза, гомогенизации саркоплазмы. Отмечены контрактурные изменения, проявляющиеся эозинофильными полосами в саркоплазме, извитостью мышечных волокон (рис. 2Г). Наряду с этим верифицировались гипертрофические изменения некоторых ядер кардиомиоцитов.

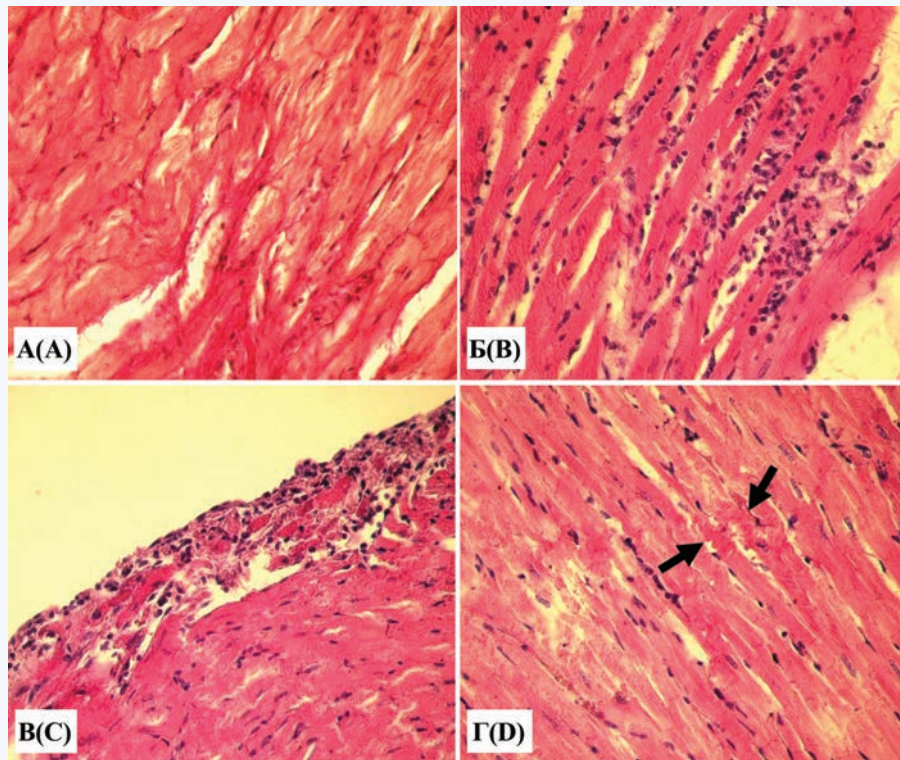


Рис. 2. Гистологические изменения сердца 18-месячных белых крыс, содержащихся на обычной диете (группа 3): А – разрастание коллагеновых волокон, обладающих фуксифилией (красный цвет), между кардиомиоцитами; Б – выраженная пролиферация клеток стромы миокарда; В – клеточная инфильтрация перикарда; Г – контрактурные изменения кардиомиоцитов (стрелки). Окраска: А – по Ван Гизону; Б, В, Г – гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

Fig. 2. Histological changes in the heart of 18-month-old white rats kept on a normal diet (group 3): А – proliferation of collagen fibers with fuchsinophilia (red color) between cardiomyocytes; В – pronounced proliferation of myocardial stroma cells; С – cellular infiltration of the pericardium; D – contracture changes in cardiomyocytes (arrows). Staining: А – according to Van Gieson; В, С, D – with hematoxylin and eosin. Magnification x 400

В группе 4 наблюдались выраженные деструктивные изменения значительного количества кардиомиоцитов, проявлявшиеся потерей поперечной исчерченности и гомогенным прокрашиванием саркоплазмы, утратой сродства к эозину либо очаговой повышенной эозинофилией, кариопикнозом и дистопией ядер к периферии мышечного волокна (рис. 3А). В некоторых кардиомиоцитах возникал отек, опустошение перинуклеарной зоны цитоплазмы, проявлявшееся резким снижением ее сродства к красителям (рис. 3Б).

Отмечалась фрагментация части сердечных мышечных волокон (рис. 3В). Обнаруживались лейкостазы в венулах, прикраевое стояние лимфоцитов и миграция их в соединительную ткань стромы. Имела место очаговая выраженная лимфо-моноцитарная инфильтрация перикарда, разрастание в нем соединительнотканых

волокон. Сформированы обширные очаги фиброза в миокарде (рис. 3Г). Для количественной оценки степени поражения миокарда левого желудочка подсчитывали среднее содержание в поле зрения микроскопа неизмененных и измененных кардиомиоцитов. В качестве критериев повреждения кардиомиоцитов использовали такие отчетливо выявляемые морфологические изменения, как кариопикноз кардиомиоцитов, проявляющийся гиперконденсацией хроматина, гиперхромией кариоплазмы, сморщиванием ядра (см. рис. 3А, В); отек перинуклеарной зоны саркоплазмы, выявляемый в виде просветленного широкого ободка вокруг ядра (см. рис. 3Б); онтрактурные изменения, проявляющиеся эозинофильными полосами в саркоплазме, извитостью мышечных волокон (см. рис. 2Г). Следует отметить, что указанные признаки нередко сочетались в одном и том же кардиомиоците.

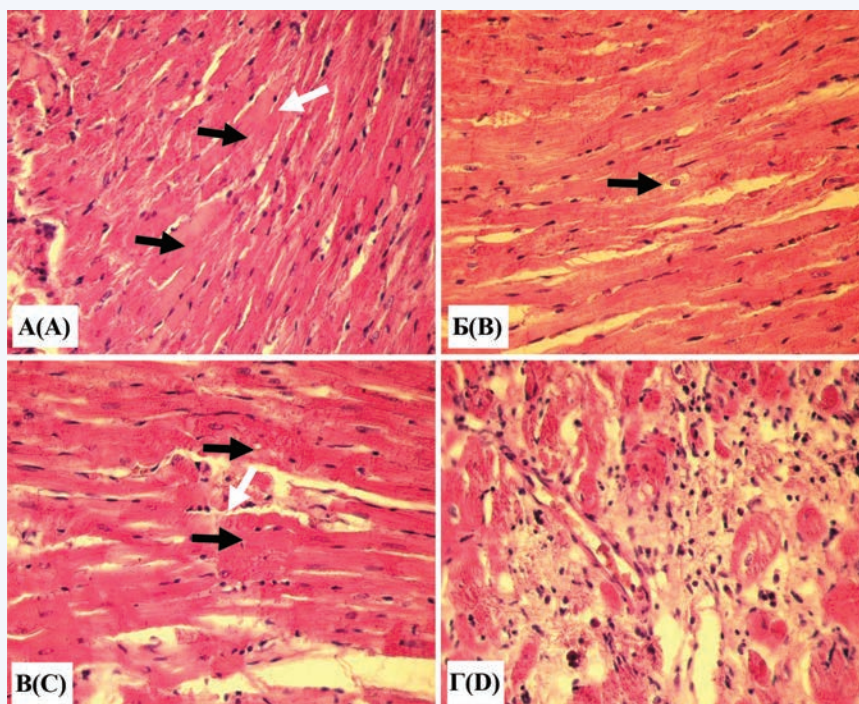


Рис. 3. Гистологические изменения сердца 18-месячных белых крыс, содержащихся на высокоуглеводной высокожировой диете (группа 4): А – деструктивные нарушения кардиомиоцитов, проявляющиеся утратой поперечной исчерченности, гомогенным окрашиванием саркоплазмы (черные стрелки), кариопикнозом и дистопией ядер (белые стрелки); Б – отек перинуклеарной зоны саркоплазмы кардиомиоцита (стрелки); В – фрагментация, глыбчатый распад кардиомиоцитов (черные стрелки), кариопикноз (белая стрелка); Г – очаг фиброза в миокарде. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

Fig. 3. Histological changes in the heart of 18-month-old albino rats kept on HCHF diet (group 4): A – destructive disorders of myocardial cells, manifested by the loss of striation, homogeneous staining of the sarcoplasm (black arrows), karyopyknosis and nuclear dystopia (white arrows); B – edema of the perinuclear zone of the sarcoplasm of the myocardial cell (arrows); C – fragmentation, clumpy disintegration of myocardial cells (black arrows), karyopyknosis (white arrow); D – focus of fibrosis in the cardiac muscle. Staining with hematoxylin and eosin. Magnification x 400

Проведенный количественный анализ показал (табл. 1), что в группе 2 значительно снижалось содержание неизменных (нормальных) кардиомиоцитов, возраста-

ло количество кардиомиоцитов с кариопикнозом и отеком перинуклеарной зоны саркоплазмы по сравнению с таковым в группе 1.

Таблица 1. Морфологические изменения кардиомиоцитов и стромы левого желудочка сердца под влиянием высокоуглеводной высокожировой диеты, $Me (Q_1-Q_3)$

Table 1. Morphological changes in myocardial cells and stroma of the left ventricle of the heart under the influence of HFHCD, $Me (Q_1-Q_3)$

Группы Groups Показатели Indicators	Крысы 5 мес. без ВУВЖД 5-month-old rats without HCHF	Крысы 5 мес. на ВУВЖД 5-month-old rats at HCHF	Крысы 18 мес. без ВУВЖД 18-month-old rats without HCHF	Крысы 18 мес. на ВУВЖД 18-month-old rats at HCHF	Уровень значимости Significance level
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	
Неизмененные кардиомиоциты Normal myocardial cells	31,2 (30,6–31,5)	29,9 (29,3–30,2)	26,0 (25,6–26,4)	23,8 (21,3–24,7)	$p_{1-2} = 0,000340$ $p_{1-3} = 0,000003$ $p_{2-3} = 0,000037$ $p_{1-4} = 0,000001$ $p_{2-4} = 0,000030$ $p_{3-4} = 0,007950$
Кариопикноз кардиомиоцитов Karyopyknosis of myocardial cells	0,4 (0,3–0,4)	1,3 (1,2–1,5)	2,5 (2,2–2,7)	3,1 (1,9–6,0)	$p_{1-2} = 0,000004$ $p_{1-3} = 0,000003$ $p_{2-3} = 0,000003$ $p_{1-4} = 0,000001$ $p_{2-4} = 0,000001$ $p_{3-4} = 0,251210$
Перинуклеарный отек в кардиомиоцитах Perinuclear edema in myocardial cells	0,5 (0,3–0,6)	1,2 (0,9–1,3)	1,5 (1,4–1,5)	1,4 (1,2–2,1)	$p_{1-2} = 0,000004$ $p_{1-3} = 0,000003$ $p_{2-3} = 0,000037$ $p_{1-4} = 0,000001$ $p_{2-4} = 0,01561$ $p_{3-4} = 0,60473$

Окончание табл. 1
End of table 1

Группы Groups Показатели Indicators	Крысы 5 мес. без ВУВЖД 5-month-old rats without HCHFD	Крысы 5 мес. на ВУВЖД 5-month-old rats at HCHFD	Крысы 18 мес. без ВУВЖД 18-month-old rats without HCHFD	Крысы 18 мес. на ВУВЖД 18-month-old rats at HCHFD	Уровень значимости Significance leve
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	
Контрактурные изменения кардиомиоцитов Contracture changes in myocardial cells	0,1 (0–0,2)	0,1 (0,1–0,1)	1,1 (1,0–1,5)	1,1 (0,9–2,5)	$p_{1-2} = 0,79501$ $p_{1-3} = 0,000003$ $p_{2-3} = 0,000003$ $p_{1-4} = 0,00001$ $p_{2-4} = 0,00001$ $p_{3-4} = 0,34937$
Всего кардиомиоцитов в поле зрения Total myocardial cells in view	32,0 (31,0–32,2)	32,4 (31,8–32,8)	31,4 (30,8–32,0)	29,5 (29,1–30,9)	$p_{1-2} = 0,165860$ $p_{1-3} = 0,122911$ $p_{2-3} = 0,503240$ $p_{1-4} = 0,00449$ $p_{2-4} = 0,010573$ $p_{3-4} = 0,072001$
Удельные объемы соединительной ткани, % Specific volumes of co - nective tissue, %	6,8 (6,4–7,2)	8,8 (8,6–9,2)	9,2 (8,4–9,2)	11,2 (10,8–11,2)	$p_{1-2} = 0,000001$ $p_{1-3} = 0,000022$ $p_{2-3} = 0,494507$ $p_{1-4} = 0,000001$ $p_{2-4} = 0,000001$ $p_{3-4} = 0,000006$

Примечание: p_{1-2} – уровень статистической значимости различий между группами 1 и 2, p_{1-3} – уровень статистической значимости различий между группами 1 и 3, p_{2-4} – уровень статистической значимости различий между группами 2 и 4, p_{3-4} – уровень статистической значимости различий между группами 3 и 4.

Note: p_{1-2} – statistical significance of differences between groups 1 and 2, p_{1-3} – statistical significance of differences between groups 1 and 3, p_{2-4} – statistical significance of differences between groups 2 and 4, p_{3-4} – statistical significance of differences between groups 3 and 4

Между группами 1 и 2 не выявлено значимых различий по критерию контрактурных нарушений кардиомиоцитов. В группе 3 зарегистрированы весьма выраженные возрастные изменения миокарда, проявившиеся значимым увеличением количества кардиомиоцитов с кардиопикнозом, отеком перинуклеарной зоны саркоплазмы и контрактурными нарушениями по сравнению с аналогичными показателями в группах 1 и 2. В группе 4 значительно уменьшалось количество неизмененных кардиомиоцитов по сравнению с таковым в группах 1–3, а также снижалось содержание кардиомиоцитов в поле зрения микроскопа, что могло быть связано с их гибелью. По критериям кардиопикноза, отека перинуклеарной зоны саркоплазмы и контрактурным нарушениям в группе 4 изменения кардиомиоцитов были более выраженными, чем в группах 1 и 2, но значимо не отличались от наблюдавшихся в группе 3. Содержание кардиомиоцитов с кардиопикнозом в группе 4 было наибольшим, значимо превышало таковое в группах 1 и 2 и имело тенденцию к увеличению по сравнению с зарегистрированным в группе 3.

Морфометрия удельных объемов соединительной ткани в миокарде левого желудочка (см. табл. 1) показала увеличение данного показателя у молодых крыс, содержащихся на ВУВЖД (группа 2), при сравнении с таковым у животных без диеты (группа 1). У старых крыс без диеты (группа 3) удельный объем соединительной ткани был выше, чем у молодых (группа 1). Но наибольших значений удельный объем соединительной ткани достигал у старых животных на ВУВЖД (группа 4), значимо превышая аналогичные показатели в остальных группах.

Биохимические исследования выявили возрастные различия (группы 1 и 3) в содержании фибронектина, ТФРбета-1 и ФРСТ у крыс на стандартной диете (табл. 2). Назначение ВУВЖД способствовало повышению уровней фибронектина у животных в обеих возрастных группах с преобладанием в группе 4. Концентрация ТФРбета-1 и ФРСТ у крыс на ВУВЖД имела выраженную тенденцию к увеличению при сравнении с таковой в соответствующих возрастных группах животных, содержащихся на стандартной диете.

Таблица 2. Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на содержание фибронектина, трансформирующего фактора роста бета 1 и фактора роста соединительной ткани в сыворотке крови белых крыс, $Me (Q_1-Q_3)$

Table 2. Influence of HCHCD on the content of fibronectin TGFβ-1, and CTGF in the blood serum of white rats, $Me (Q_1-Q_3)$

Группы Groups Показатели Indicators	Крысы 5 мес. без ВУВЖД 5-month-old rats without HCHCD	Крысы 5 мес. на ВУВЖД 5-month-old rats at HCHCD	Крысы 18 мес. без ВУВЖД 18-month-old rats without HCHCD	Крысы 18 мес. на ВУВЖД 18-month-old rats at HCHCD	Уровень значимости Significance leve
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	
ТФРбета-1, пг/мл TGFβ-1, pg/ml	14262 (8039–23429)	20435 (14072– 22713)	33765,81 (24232– 45736)	36252 (19477– 41313)	$p_{1-2} = 0,288488$ $p_{1-3} = 0,004072$ $p_{2-4} = 0,030369$ $p_{3-4} = 0,778196$

Окончание табл. 2
End of table 2

Группы Groups Показатели Indicators	Крысы 5 мес. без ВУВЖД 5-month-old rats without HCHCD	Крысы 5 мес. на ВУВЖД 5-month-old rats at HCHCD	Крысы 18 мес. без ВУВЖД 18-month-old rats without HCHCD	Крысы 18 мес. на ВУВЖД 18-month-old rats at HCHCD	Уровень значимости Significance level
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	
Фибронектин, мг/дл Fibronectin, mg/dl	21,7 (19,2–23,5)	25,7 (23,3–31,1)	31,2 (23,3–37,4)	41,7 (37,4–49,2)	$p_{1-2} = 0,014179$ $p_{1-3} = 0,012346$ $p_{2-4} = 0,001437$ $p_{3-4} = 0,006362$
ФРСТ, пг/мл CTGF, pg/ml	99,8 (61,6–155,5)	130,0 (91,9–168,7)	275,7 (207,3–330,8)	337,9 (277,2–474,6)	$p_{1-2} = 0,452913$ $p_{1-3} = 0,005411$ $p_{2-4} = 0,003095$ $p_{3-4} = 0,309880$

Примечание: p_{1-2} – уровень статистической значимости различий между группами 1 и 2, p_{1-3} – уровень статистической значимости различий между группами 1 и 3, p_{2-4} – уровень статистической значимости различий между группами 2 и 4, p_{3-4} – уровень статистической значимости различий между группами 3 и 4.

Note: p_{1-2} – statistical significance of differences between groups 1 and 2, p_{1-3} – statistical significance of differences between groups 1 and 3, p_{2-4} – statistical significance of differences between groups 2 and 4, p_{3-4} – statistical significance of differences between groups 3 and 4.

Биохимические исследования выявили возрастные различия (группы 1 и 3) в содержании фибронектина, ТФР бета1 и ФРСТ у крыс на стандартной диете (см. табл. 2). Назначение ВУВЖД способствовало повышению уровней фибронектина у животных в обеих возрастных группах с преобладанием в группе 4. Концентрация ТФРбета-1 и ФРСТ у крыс на ВУВЖД имела выраженную тенденцию к увеличению при сравнении с таковой в соответствующих возрастных группах животных, содержащихся на стандартной диете.

Обсуждение

Проведенные нами исследования позволили обнаружить отчетливые возрастные изменения миокарда, проявившиеся у 18-месячных крыс на стандартной диете увеличением удельного объема соединительной ткани стромы, количества кардиомиоцитов с деструктивными нарушениями в виде кариопикноза, отека перинуклеарной зоны цитоплазмы, с контрактурными повреждениями, уменьшением количества неизмененных кардиомиоцитов по сравнению с данными показателями у молодых 5-месячных животных. Зарегистрировано возрастное увеличение фибронектина и ФРСТ в сыворотке крови, сопровождавшиеся морфологическими признаками разрастания стромы миокарда.

Потеря кардиомиоцитов и фиброз являются типичными признаками старения сердца. Нагрузка на кардиомиоциты в фиброзном сердце увеличивается, что вызывает дополнительную гибель кардиомиоцитов и замену их фиброзным материалом, создавая порочный круг дальнейшего снижения функции сердца [4, 5].

Однако есть точка зрения, что возрастные нарушения в сердце обусловлены патологическими процессами, связанными со старением, а не самими процессами старения [6]. «Нормальные» возрастные изменения служат основой, которая поддерживает снижение пластичности и ограниченную способность к ремоделированию тканей при патологическом состоянии миокарда [7]. Процесс старения генетически запрограммирован, но изменяется под влиянием факторов окружающей среды, поэтому скорость старения миокарда у разных людей может сильно различаться [8]. В этой связи в на-

стоящем исследовании была предпринята попытка оценить влияние ВУВЖД на миокард в возрастном аспекте. В нашей предыдущей публикации [9] было показано, что ВУВЖД вызывала у белых крыс повышение массы тела, концентрации глюкозы в сыворотке крови, интеграционного индекса инсулинорезистентности, артериального давления, накопление триглицеридов в печени, которые являются характерными чертами метаболического синдрома. В аорте было выявлено увеличение коллагена и замещение им эластических мембран, приводящие к потере эластичности, увеличению жесткости и утолщению сосудистой стенки, что играет существенную роль в механизмах повышения артериального давления. Все перечисленные изменения чаще появлялись или преобладали у старых животных на ВУВЖД по сравнению с таковыми у молодых. Изменения метаболизма липидов в сыворотке крови, печени и почек также были более выражены у старых животных, чем у молодых на ВУВЖД [2].

Указанные метаболические нарушения, повышенное артериальное давление, очевидно, играют важную роль в механизмах сердечных нарушений. В сердце молодых крыс (5-месячных), содержащихся на ВУВЖД, нами было зарегистрировано значимое увеличение числа кардиомиоцитов с альтеративными нарушениями в отличие от аорт, в которых у молодых животных признаки повреждения были невыраженными. Критериями поражения кардиомиоцитов был кариопикноз, свидетельствующий о гибели клеток, а также отек перинуклеарной зоны саркоплазмы, указывающий на глубокие нарушения ядерно-цитоплазматических взаимоотношений. Отек или «просветление» околоядерной зоны цитоплазмы весьма характерны для кардиомиоцитов при различных патологических состояниях, например, при антрациклиновой кардиомиопатии, выраженной гиперхолестеринемии [10], иммобилизационном стрессе [11], при которых происходят литические изменения миофибрилл, митохондрий, накопление лизосом, липофуцина именно в обширной перинуклеарной части саркоплазмы. У старых животных, содержащихся на ВУВЖД, доля кардиомиоцитов с кариопикнозом была значимо выше, чем у молодых, достигая порядка 10%. Возрастало количество сердечных

мышечных клеток с контрактурными изменениями, в то время как содержание неизмененных кардиомиоцитов у старых животных на ВУВЖД было значимо меньше, чем у старых крыс на стандартной диете. Кроме того, значительно уменьшалось количество кардиомиоцитов в поле зрения, что можно расценивать как их гибель и замещение соединительной тканью, удельные объемы которой у старых крыс на ВУВЖД были больше, чем в остальных экспериментальных группах. Выявленное нами повышение концентрации фибронектина, ТФРбета-1, ФРСТ в сыворотке крови соответствовало росту соединительнотканного компонента миокарда. Следует также иметь в виду и реактивный фиброз, возникающий для замещения некротизированных и апоптозных кардиомиоцитов при старении [7].

Обращает на себя внимание очаговая клеточная инфильтрация стромы миокарда и эпикарда, появляющаяся у молодых и значительно усиливающаяся у старых животных на ВУВЖД. Инфильтраты локализовались в основном периваскулярно и содержали преимущественно лимфоциты и макрофаги, в меньшей степени нейтрофильные лейкоциты. Подобные инфильтраты были обнаружены у старых крыс на стандартной диете, что подчеркивало сходство морфологических процессов, связанных с возрастом и ВУВЖД. Отмечается связь лимфоцитарной инфильтрации периваскулярных областей стареющего сердца с профилем воспалительного гена и возрастным фиброзом миокарда, что нуждается в дальнейшем детальном исследовании [4].

Воспалительный компонент в виде лейкоцитарной инфильтрации миокарда ранее описан в экспериментах с использованием высокоуглеводной и/или высокожировой диет [12–14], а также с моделированием метаболического синдрома [3]. Было показано, что рекрутированные воспалительные клетки действуют на фибробласты, которые играют центральную роль в прогрессировании фиброза при высокожировой диете, также отмечена высокая экспрессия фибронектина и коллагенов 1-го и 2-го типов в сердечной мышце, влекущая массивный фиброз [15]. Результаты наших экспериментов, свидетельствующие об увеличении концентрации фибронектина и ФРСТ в сыворотке крови, соответствуют вышеприведенным литературным данным и указывают на их высокую диагностическую ценность. Связанные со старением и ВУВЖД фиброзные изменения миокарда влекут за собой увеличение жесткости сердца, нарушение проводимости, аритмии и сердечную недостаточность [4, 5, 7, 8, 12, 13, 16, 17].

Заключение

ВУВЖД ускоряет и усиливает возрастные изменения миокарда белых крыс, проявляющиеся увеличением удельного объема соединительной ткани и очаговым фиброзом, которые сопровождаются повышением концентрации фибронектина, ТФРбета-1, ФРСТ в сыворотке крови, лимфо-моноцитарной инфильтрацией стромы, повреждением и гибелью кардиомиоцитов. Данные гистологические и биохимические изменения у старых крыс на ВУВЖД более выражены, чем у молодых животных.

Литература / References

- Sun M., Tan Y., Rexiati M., Dong M., Guo W. Obesity is a common soil for premature cardiac aging and heart diseases – Role of autophagy. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 2019;1865(7):1898–1904. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.09.004.
- De Castro U.G.M., dos Santos R.A.S.A.S., Silva M.E., de Lima W.G., Campagnole-Santos M.J., Alzamora A.C. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis.* 2013;(12–136). DOI: 10.1186/1476-511X-12-136.
- Martinelli I., Tomassoni D., Moruzzi M., Roy P., Cifani C., Amenta F. et al. Cardiovascular Changes Related to Metabolic Syndrome: Evidence in Obese Zucker Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(6):2035. DOI: 10.3390/ijms21062035.
- Boyle A.J., Shih H., Hwang J., Ye J., Lee B., Zhang Y. et al. Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy. *Exp. Gerontol.* 2011;46(7):549–559. DOI: 10.1016/j.exger.2011.02.010.
- Piek A., de Boer R.A., Silljé H.H.W. The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2016;21(2):199–211. DOI: 10.1007/s10741-016-9536-9.
- Klausner S.C., Schwartz A.B. The aging heart. *Clin. Geriatr. Med.* 1985;1(1):119–141. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3913496/>
- Tracy E., Rowe G., LeBlanc A.J. Cardiac tissue remodeling in healthy aging: the road to pathology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2020;319(1):C166–C182. DOI: 10.1152/ajpcell.00021.2020.
- Nakou E.S., Parthenakis F.I., Kallergis E.M., Marketou M.E., Nakos K.S., Vardas P.E. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *Int. J. Cardiol.* 2016;209:167–175. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.02.039.
- Logvinov S.V., Naryzhnaya N.V., Kurbatov B.K., Gorbunov A.S., Birulina Y.G., Maslov L.L. et al. High carbohydrate high fat diet causes arterial hypertension and histological changes in the aortic wall in aged rats: The involvement of connective tissue growth factors and fibronectin. *Exp. Gerontol.* 2021;154:111543. DOI: 10.1016/j.exger.2021.111543.
- Неломнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: Морфологические основы и молекулярные механизмы. М.: Изд-во РАМН; 2003:255. [Nepomnyashchih L.M., Lushnikova E.L., Semenov D.E. Regenerative plastic insufficiency of the heart: Morphological bases and molecular mechanisms. Moscow: Publishing House RAMS; 2003:255].
- Kurbatov B.K., Prokudina E.S., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Logvinov S.V., Gorbunov A.S. et al. The role of adrenergic and muscarinic receptors in stress-induced cardiac injury. *Pflugers Arch.* 2021; 473(10):1641–1655. DOI: 10.1007/s00424-021-02602-6.
- Sahraoui A., Dewachter C., de Medina G., Naeije R., Bouguerra S.A., Dewachter L. Myocardial Structural and Biological Anomalies Induced by High Fat Diet in Psammomys obesus Gerbils. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148117. DOI: 10.1371/journal.pone.0148117.
- Poudyal H., Panchal S.K., Ward L.C., Waanders J., Brown L. Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012;302(12): E1472–1482. DOI: 10.1152/ajpendo.00102.2012.
- Bhandarkar N.S., Brown L., Panchal S.K. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. *Nutr. Res.* 2019;62:78–88. DOI: 10.1016/j.nutres.2018.11.002.
- Elrashidy R. Dysregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling and activation of fibrogenic pathways in hearts of high fat diet-fed rats. *Mol. Biol. Rep.* 2020;47(4):2821–2834. DOI: 10.1007/s11033-020-05360-3.
- Comunoglu C., Comunoglu N., Eren B., Tanrıöver O., Türkmen N., Gündoğmuş U.N. et al. Age-related histopathological changes in the cardiac conducting system in the Turkish population: an evaluation of 202 autopsy cases. *Folia Morphol.* 2012;71(3):178–182. URL: https://journals.viamedica.pl/folia_morphologica/article/view/18756.
- Pudil R. Age-related myocardial remodeling: myth or reality? *Vnitř. Lek.* 2020;66(8):507–511. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33740851/>

Информация о вкладе авторов

Логвинов С.В. – разработка концепции, подготовка морфологической части текста статьи, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

Мустафина Л.Р. – окраска срезов, подготовка иллюстративного материала, оформление окончательного варианта рукописи.

Курбатов Б.К. – моделирование метаболического синдрома у крыс, забор и обработка биологического материала для биохимических исследований, проведение биохимических исследований, разработка концепции статистической обработки данных.

Сиротина М.А., Горбунов А.С. – забор и первичная обработка биологического материала для гистологического исследования, подготовка гистологических срезов для окрашивания.

Нарыжная Н.В. – разработка концепции исследования, анализ полученных данных, доработка исходного варианта рукописи.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ручаясь за их точность и безупречность.

Сведения об авторах

Логвинов Сергей Валентинович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-9876-6957.

E-mail: s_logvinov@mail.ru.

Мустафина Лилия Рамильевна, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3526-7875.

E-mail: irmustafina@yandex.ru.

Курбатов Борис Константинович, младший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9603-822X.

E-mail: bobersanker@gmail.com.

Сиротина Мария Александровна, аспирант, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-4502-0836.

E-mail: sirotina_maria@mail.ru.

Горбунов Александр Сергеевич, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-5890-071X.

E-mail: barabator@sibmail.com.

Нарыжная Наталья Владимировна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-2264-1928.

E-mail: natalynar@yandex.ru.

 **Мустафина Лилия Рамильевна**, irmustafina@yandex.ru.

Information on author contributions

Logvinov S.V. – development of the concept, preparation of the morphological part of the text, substantiation of the manuscript, verification of critically intellectual content and final approval of the manuscript for publication.

Mustafina L.R. – staining of histological sections, preparation of illustrative material and design of the final version of the manuscript.

Kurbatov B.K. – modeling of the metabolic syndrome in rats, sampling and processing of biological material for biochemical studies, conducting biochemical studies, developing the concept of statistical data processing.

Sirotnin M.A. and Gorbunov A.S. – sampling and primary processing of biological material for histological examination, preparation of histological sections for staining.

Naryzhnaya N.V. – development of the concept of the study, data analysis, revision of the original version of the manuscript.

All authors gave their final consent to the submission of the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of the work, vouching for their accuracy and flawlessness.

Information about the authors

Sergey V. Logvinov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Histology, Embryology, and Cytology, Siberian State Medical University. ORCID 0000-0002-9876-6957.

E-mail: s_logvinov@mail.ru.

Lilija R. Mustafina, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Histology, Embryology, and Cytology, Siberian State Medical University. ORCID 0000-0003-3526-7875.

E-mail: irmustafina@yandex.ru.

Boris K. Kurbatov, Junior Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-9603-822X.

E-mail: bobersanker@gmail.com.

Maria A. Sirotnina, Postgraduate Student, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-4502-0836.

E-mail: sirotina_maria@mail.ru.

Alexander S. Gorbunov, MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-5890-071X.

E-mail: barabator@sibmail.com.

Natalia V. Naryzhnaya, Dr. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-2264-1928.

E-mail: natalynar@yandex.ru.

 **Lilija R. Mustafina**, irmustafina@yandex.ru.

Received September 19, 2022

Поступила 19.09.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-99-105>
УДК 616-008.9:577.121.7:611.018.26]-092.9

Функциональное состояние системы глутатиона в жировой ткани крыс при метаболическом синдроме

Ю.Г. Бирулина, В.В. Иванов, Е.Е. Буйко, О.В. Воронкова

Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

Аннотация

Цель исследования: изучить функциональное состояние компонентов глутатион-зависимой антиоксидантной системы в жировой ткани крыс при экспериментальном метаболическом синдроме (МС).

Материал и методы. Модель МС была воспроизведена на крысах-самцах линии Wistar с использованием высокожировой и высокоуглеводной диеты (ВЖВУД). У животных измеряли массу тела и жировой ткани. В сыворотке крови оценивали содержание глюкозы, инсулина, лептина, триацилглицеролов, холестерина. В эпидидимальной жировой ткани определяли уровень активных форм кислорода (АФК) флуоресцентным методом, концентрацию восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона, активность ферментов глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы оценивали спектрофотометрически.

Результаты. Установлено, что ВЖВУД приводила к увеличению массы тела, ожирению, гипергликемии, инсулинорезистентности, дислипидемии, лептинемии у крыс опытной группы. Повышение массы жировой ткани имело положительную взаимосвязь с увеличением концентрации глюкозы, лептина в сыворотке крови и уровня АФК в эпидидимальной жировой ткани крыс с МС. Обнаружено, что уровень общего глутатиона в жировой ткани крыс опытной группы снижался главным образом за счет уменьшения содержания GSH. У крыс, получавших ВЖВУД, также отмечалось снижение активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, но повышение глутатионредуктазной активности.

Заключение. Ожирение как ключевой компонент МС является триггером развития инсулинорезистентности, хронического воспаления и окислительного стресса. В исследовании показано, что при МС и ожирении происходит сдвиг редокс-баланса адипоцитов в сторону прооксидантной активности, что выражается в уменьшении отношения GSH/GSSG и снижении активности глутатион-зависимых ферментов антиперекисной защиты.

Ключевые слова:	глутатион, активные формы кислорода, окислительный стресс, метаболический синдром, ожирение.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20039 (https://rscf.ru/project/22-25-20039/) и средств Администрации Томской области.
Соответствие принципам этики:	исследования были выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, одобрены Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 25.04.2022 г.).
Для цитирования:	Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Воронкова О.В. Функциональное состояние системы глутатиона в жировой ткани крыс при метаболическом синдроме. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):99–105. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-99-105 .

Functional state of the glutathione system in the adipose tissue of rats with metabolic syndrome

Julia G. Birulina, Vladimir V. Ivanov, Evgeny E. Buyko, Olga V. Voronkova

Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Moskovsky trakt str., Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Aim: To study the functional state of the components of the glutathione-dependent antioxidant system in the adipose tissue of rats with experimental metabolic syndrome (MetS).

Бирулина Юлия Георгиевна, e-mail: birulina20@yandex.ru.

Material and Methods. The MetS model was carried out on male Wistar rats using a high-fat, high-carbohydrate diet (HFHCD). Body and adipose tissue weight were measured. Blood serum levels of glucose, insulin, leptin, triacylglycerides and cholesterol were assessed. In epididymal adipose tissue the level of reactive oxygen species (ROS) was determined by fluorescent method. The concentration of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase enzymes were assessed spectrophotometrically in epididymal adipose tissue.

Results. It was found that HFHCD led to an increase in body weight, obesity, hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, and leptinemia in the experimental group rats. An increase in adipose tissue mass had a positive correlation with an increase in the concentration of glucose, serum leptin, and ROS levels in the epididymal adipose tissue of rats with MetS. It was found that the level of total glutathione in the adipose tissue of the experimental group rats decreased mainly due to a decrease in the level of GSH. The rats receiving HFHCD also showed a decrease in the activity of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase, but the activity of glutathione reductase increased.

Conclusion. Obesity, as a key component of MetS, is a trigger of insulin resistance, chronic low-grade inflammation and oxidative stress. The study showed that the development of MetS and obesity in the experimental animal group is accompanied by a shift of adipocyte redox balance toward oxidative stress, which is expressed in a decrease of GSH/GSSG ratio and glutathione-dependent antiperoxide protection enzymes activity.

Keywords:	glutathione, reactive oxygen species, oxidative stress, metabolic syndrome, obesity.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-25-20039 (https://rscf.ru/project/22-25-20039/), and funded by the Administration of the Tomsk Region.
Adherence to ethical standards:	the studies were carried out in compliance with the principles of the European Community Directives (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki, approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Siberian State Medical University (protocol No. 1, 25.04.2022).
For citation:	Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Voronkova O.V. Functional state of the glutathione system in the adipose tissue of rats with metabolic syndrome. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):99–105. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-99-105 .

Введение

Как известно, метаболический синдром (МС) характеризуется комплексом клинико-лабораторных маркеров, ассоциированных с инсулинорезистентностью и ожирением [1–3]. Одним из основных проявлений дисфункции клеточных элементов жировой ткани (адипоцитов и клеток стромально-сосудистой фракции) при ожирении является нарушение их секреторной активности, которое характеризуется усилением наработки провоспалительных и снижением продукции противовоспалительных факторов [4]. Существует прямая связь между хроническим воспалением, индуцированным клетками жировой ткани, и развитием окислительного стресса [5, 6]. Исследования подтверждают тот факт, что медиаторы хронического воспаления формируют и усиливают реакции окислительного стресса, что делает его неотъемлемым патогенетическим фактором ожирения и его возможных осложнений, таких как сахарный диабет 2-го типа, сердечно-сосудистые заболевания [7].

Несмотря на то, что активные формы кислорода (АФК) выполняют важную роль регуляторов в многочисленных межклеточных сигнальных каскадах, их высокая концентрация может опосредовать повреждение клеточных компонентов и вызвать нарушение внутриклеточного метаболизма [8]. Поддержание на определенном уровне внутриклеточных механизмов антиоксидантной защиты обеспечивает динамическое равновесие системы генерации свободных радикалов [9, 10]. Одним из них является система глутатиона, включающая восстановленную (GSH) и окисленную (GSSG) формы трипептида, а также антиоксидантные ферменты (глутатионредуктазу, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу) [11]. Сведения о ее

роли в контроле окислительно-восстановительного равновесия в клетках жировой ткани немногочисленны и главным образом сводятся к изучению активности отдельных антиоксидантных ферментов [12, 13].

Цель исследования: изучение функционального состояния компонентов глутатион-зависимой антиоксидантной системы в жировой ткани крыс при экспериментальном МС.

Материал и методы

Модель диет-индуцированного МС была воспроизведена на 12 крысах-самцах аутбредной линии Wistar (масса – $242,3 \pm 38,5$ г; возраст – 6 нед. на начало исследования) в течение 12 нед. по ранее описанной методике [14]. В контрольную группу было включено 11 крыс, сопоставимых по массе и возрасту, которые в течение всего эксперимента находились на стандартном лабораторном корме со свободным доступом к пище и воде. Исследования были выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации, одобрены Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 25.04.2022 г.).

Спустя 12 нед. животных выводили из эксперимента CO_2 -эвтаназией. Выполняли забор крови из сердца, которую затем центрифугировали 10 мин при 2000 g для получения сыворотки. Извлекали и взвешивали висцеральную жировую ткань (мезентериальную, эпидидимальную и забрюшинную жировую клетчатку), фрагменты эпидидимальной жировой ткани замораживали в жидком азоте. Полученные аликвоты сыворотки крови и образцы жировой ткани хранили при температуре не выше -70°C .

В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы (набор Glucose-TR, Chronolab, Испания), триацилглицеролов, холестерина (наборы Триглицериды, Холестерин, Ольвекс Диагностикум, РФ), инсулина (Insulin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, США) и лептина (Rat Leptin ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР). Индекс HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) рассчитывали как (сывороточный инсулин) × (сывороточная глюкоза) / 22,5.

Содержание АФК в эпидидимальной жировой ткани определяли по методу L. Liu и соавт. [15], для чего навески жировой ткани (50 мг) после размораживания переносили в буферный раствор (5 мМ HEPES в PBS, pH 7,4), содержащий 10 мкМ 2,3-дигидродихлорфлуоресцеина диацетат, и инкубировали 1 ч при 37 °С. После инкубации образцы ткани трижды промывали буферным раствором, затем добавляли 300 мкл лизирующего буфера (0,1% SDS, 0,05 М Tris-HCl, pH 7,4) и инкубировали 15 мин при 4 °С с последующим центрифугированием при 16000 г в течение 20 мин. Супернатант собирали и оценивали флуоресценцию при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 485 нм с помощью микропланшетного ридера (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария).

Для определения содержания восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона жировую ткань после размораживания (100 мг) гомогенизировали в 1,9 мл 5% раствора сульфосалициловой кислоты, затем центрифугировали при 15000 г (2–4 °С, 15 мин), собирали супернатант. Принцип метода определения основан на взаимодействии GSH с 5,5-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, имеющей максимум поглощения при длине волны 412 нм [16]. При этом образуется GSSG, который восстанавливается глутатионредуктазой, а GSH вновь взаимодействует с ДТНБ. Для определения GSSG пробы предварительно инкубировали с блокатором SH-групп – 2-винилпиридином. Расчет содержания общего глутатиона и GSSG производили с помощью калибровочных графиков для растворов GSH и GSSG (MP Biomedicals, США) в концентрациях от 0,1 до 150 нМ. Уровень GSH рассчитывали как разницу между концентрацией общего глутатиона и GSSG. Результаты представляли в нмоль/мг белка.

Для измерения активности антиоксидантных ферментов готовили гомогенат из эпидидимальной жировой ткани в 0,05 М калий-фосфатном буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, pH 7,5 (соотношение ткань: буфер составляло 1 : 3) при 2–4 °С. Полученные гомогенаты центрифугировали при 15000 г (2–4 °С, 15 мин), собирали супернатант. Активность глутатионредуктазы оценивали по кинетике изменения концентрации тио-2-нитробензойной кислоты в присутствии НАДФН₂ на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, РФ) при длине волны 412 нм.

Глутатионпероксидазную активность определяли в сопряженной глутатионредуктазной системе по скорости окисления НАДФН₂ при длине волны 340 нм с гидропероксидом трет-бутила в качестве субстрата. Активность глутатион-S-трансферазы оценивали по скорости реакции образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом при длине волны 340 нм. Активность ферментов выражали в нмоль/(мин*мг белка). Количественное определение белка выполняли в реакции с бичинхоновой кислотой (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, США).

Статистическую обработку результатов исследований проводили в программе SPSS STATISTICS 23 (IBM, США). Количественные данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$), неподчиняющиеся – в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q25; Q75). Для анализа различий между выборками использовали *t*-критерия Стьюдента или *U*-критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи между показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

ВЖВУД, использованная в эксперименте для моделирования алиментарного МС у крыс, вызывала увеличение массы тела животных, удельной массы висцеральной жировой ткани. ВЖВУД способствовала повышению уровня глюкозы, инсулина и лептина в сыворотке крови крыс опытной группы (табл. 1). Корреляционный анализ показал сильную прямую корреляционную связь между содержанием глюкозы и инсулина в крови ($r = 0,814$; $p < 0,001$). Величина индекса инсулинорезистентности HOMA-IR у крыс с диет-индуцированным МС статистически значимо превышала таковую у группы контроля. Увеличение концентрации лептина в крови животных опытной группы положительно коррелировало с уровнем глюкозы ($r = 0,839$; $p < 0,001$), массой тела ($r = 0,560$; $p = 0,005$) и массой абдоминального жира ($r = 0,475$; $p = 0,022$). У крыс опытной группы также наблюдалось статистически значимое увеличение содержания триацилглицеролов и холестерина в крови по сравнению с группой контроля (см. табл. 1).

Таблица 1. Показатели метаболического статуса крыс контрольной и опытной группы, $M \pm SD$

Table 1. Parameters of the metabolic status of rats in the control and experimental groups, $M \pm SD$

Параметры Parameters	Группа Group	
	Контрольная (n = 11) Control (n = 11)	Опытная (n = 12) Experimental (n = 12)
Масса тела, г Body weight, g	435,5 ± 27,1	481,9 ± 36,6 ($p = 0,003$)
Удельная масса жировой ткани, г Adipose tissue/body weight ratio, g	2,4 ± 0,8	3,7 ± 0,9 ($p = 0,004$)
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	5,5 ± 0,4	7,4 ± 0,8 ($p < 0,001$)
Инсулин, пмоль/л Insulin, pmol/l	11,3 ± 1,9	22,2 ± 2,6 ($p < 0,001$)
HOMA-IR	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3 ($p = 0,002$)
Лептин, нг/мл Leptin, ng/ml	2,2 ± 0,4	4,2 ± 0,4 ($p < 0,001$)
Триацилглицеролы, ммоль/л Triacylglycerols, mmol/l	0,9 ± 0,2	1,6 ± 0,4 ($p = 0,001$)
Холестерол, ммоль/л Cholesterol, mmol/l	1,8 ± 0,3	2,5 ± 0,6 ($p = 0,015$)

Примечание: здесь и в таблице 2: p – различия по сравнению с контрольной группой. HOMA-IR – гомеостатическая модель оценки инсулинорезистентности.

Note: here and in table 2: p – significance vs. control group. HOMA-IR – Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance.

Уровень АФК в эпидидимальной жировой ткани крыс с диет-индуцированным МС в 1,4 раза ($p = 0,007$) превышал значение в контрольной группе животных (табл. 2).

Таблица 2. Содержание общего глутатиона, активность глутатион-зависимых ферментов и уровень активных форм кислорода в жировой ткани крыс контрольной и опытной группы. $Me (Q_{25}; Q_{75})$

Table 2. Total glutathione content, activity of glutathione-dependent enzymes and level of reactive oxygen species in adipose tissue of rats in the control and experimental groups, $Me (Q_{25}; Q_{75})$

Параметры Parameters	Группа Group	
	Контрольная (n = 11) Control (n = 11)	Опытная (n = 12) Experimental (n = 12)
GSH+GSSG, нмоль/мг белка GSH+GSSG, nmol/mg of protein	9,5 (8,1; 9,8)	6,4 (5,7; 7,4) $p < 0,001$
GSH/GSSG	24,9 (21,5; 28,0)	11,6 (9,2; 13,4) $p < 0,001$
Глутатионредуктаза, нмоль/(мин × мг белка) Glutathione reductase, nmol/(min × mg of protein)	31,9 (26,5; 35,5)	45,2 (41,1; 60,1) $p < 0,001$
Глутатионпероксидаза, нмоль/(мин × мг белка) Glutathione peroxidase, nmol/(min × mg of protein)	154,1 (143,1; 174,9)	139,4 (105,9; 151,6) $p = 0,008$
Глутатион-S-трансфераза, нмоль/(мин × мг белка) Glutathione-S-transferase, nmol/(min × mg of protein)	397,3 (293,3; 555,3)	227,9 (145,6; 291,1) $p = 0,005$
АФК, усл. ед. ROS, a.u.	1,8 (1,3; 2,2)	2,4 (2,1; 2,6) $p = 0,007$

Примечание: p – различия по сравнению с контрольной группой, АФК – активные формы кислорода, GSH+GSSG – общий глутатион, GSH/GSSG – отношение уровня восстановленного глутатиона (GSH) к окисленному глутатиону (GSSG).

Note: p – significance vs. control group, ROS – reactive oxygen species, GSH+GSSG – total glutathione, GSH/GSSG – reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio.

Анализ показал наличие положительной прямой корреляционной связи между количеством продуцируемых АФК, концентрацией глюкозы ($r = 0,522$; $p = 0,002$), лептина ($r = 0,553$; $p = 0,006$) и удельной массой висцерального жира (рис. 1).

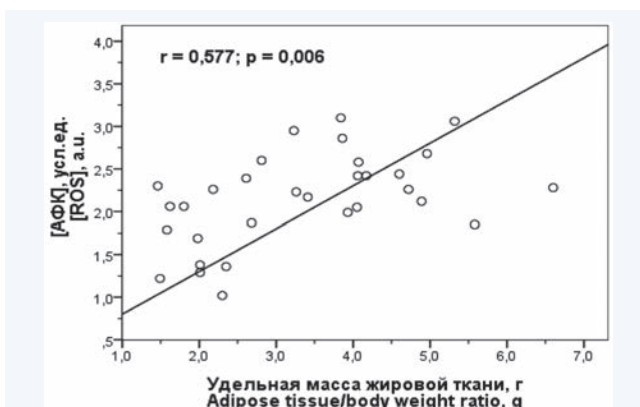


Рис. 1. Зависимость уровня активных форм кислорода от удельной массы жировой ткани крыс контрольной и опытной группы; r – коэффициент корреляции Спирмена, p – различия по сравнению с контрольной группой

Fig. 1. Relationship of the level of reactive oxygen species with the adipose tissue/body weight ratio in rats of the control and experimental groups; r – Spearman's correlation coefficient; p – significance vs. control group

Уровень общего глутатиона в жировой ткани крыс с экспериментальным МС статистически значимо снизился в 1,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с аналогичным показателем у крыс контрольной группы (см. табл. 2), что главным образом было обусловлено снижением содержания восстановленной формы трипептида (рис. 2). При этом у животных опытной группы отмечалось статистически значимое повышение содержания окисленной формы глутатиона (рис. 3).

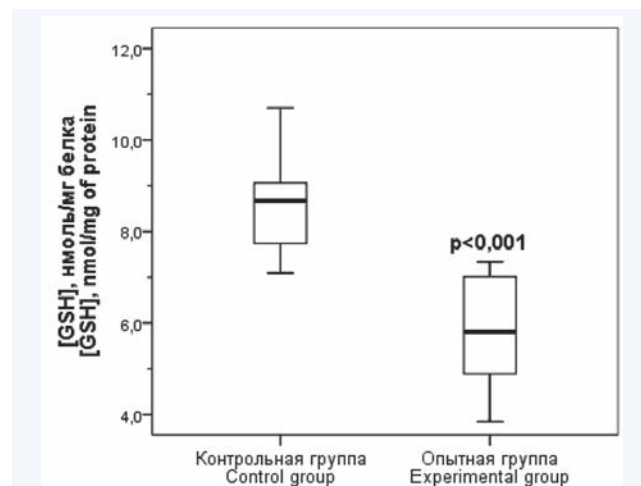


Рис. 2. Содержание восстановленного глутатиона в эпидидимальной жировой ткани крыс контрольной и опытной группы, p – различия по сравнению с контрольной группой

Fig. 2. Concentration of reduced glutathione in the epididymal adipose tissue of control and experimental rats, p – significance to control group

Рис. 3. Содержание окисленного глутатиона в эпидидимальной жировой ткани крыс контрольной и опытной группы, p – различия по сравнению с контрольной группой

Fig. 3. Concentration of oxidized glutathione (GSSG) in the epididymal adipose tissue of control and experimental rats, p – significance vs. control group

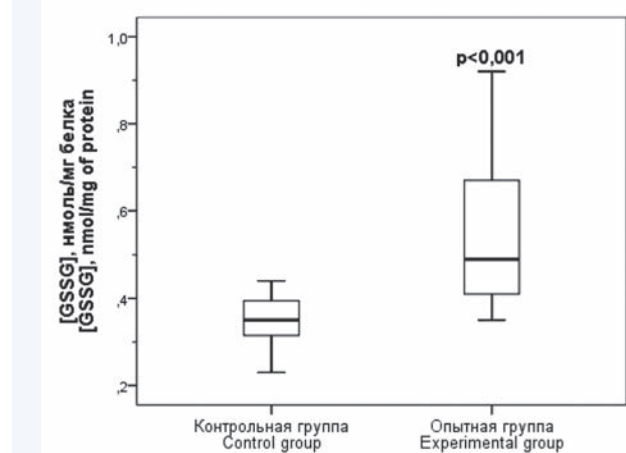


Рис. 4. Зависимость уровня восстановленного глутатиона от удельной массы жировой ткани крыс контрольной и опытной группы. r – коэффициент корреляции Спирмена, p – различия по сравнению с контрольной группой

Fig. 4. Relationship of the level of reduced glutathione with the adipose tissue/body weight ratio in rats of the control and experimental groups. r – Spearman's correlation coefficient, p – significance vs. control group

Соотношение GSH/GSSG также статистически значимо снижалось у животных с экспериментальным МС (см. табл. 2). Установлено, что между концентрацией GSH в жировой ткани и ее удельной массой наблюдалась от-

рицательная корреляция (рис. 4), тогда как между содержанием GSSG и удельной массой жировой ткани существует положительная взаимосвязь ($r = 0,573$; $p = 0,001$).

При этом содержание общего глутатиона эпидидимальной жировой ткани отрицательно коррелировало ($r = -0,477$; $p = 0,005$) с концентрацией в ней АФК. Развитие метаболических нарушений при ВЖВУД приводило к снижению активности глутатион-зависимых ферментов антиоксидантной защиты глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы (см. табл. 2) в клетках жировой ткани крыс, но, напротив, вызывало повышение глутатионредуктазной активности.

Обсуждение

Патогенез МС представляет собой сложную систему взаимодействующих факторов, характеризующих нарушения обменных процессов и внутриклеточного гомеостаза на фоне пониженной чувствительности тканей к инсулину [1, 7]. Висцеральное ожирение как один из компонентов МС является триггером для возникновения множества системных метаболических нарушений, опосредующих нейроиммуоэндокринную дисфункцию на системном уровне [4–6].

Современные исследования показывают, что гипертрофия адипоцитов тесно связана с развитием резистентности к инсулину, хроническим воспалением и окислительным стрессом [6, 9]. Отличительным признаком дисфункции адипоцитов является неспособность клеток накапливать избыток нутриентов в виде внутриклеточных липидов, что приводит к повышению концентрации триацилглицеролов и свободных жирных кислот в крови и сопровождается эктопическим накоплением жиров, например, в печени, скелетных мышцах, поджелудочной железе и миокарде.

На этом фоне в организме реализуются системные липотоксические эффекты, а жировая ткань приобретает провоспалительный функциональный статус вследствие нарушения процессов регуляции секреции адипокинов (гормонов лептина, адипонектина, резистина и др.) и адипокинов (IL-6, IL-8, TNF α , хемокина CCL2, IL-10) [1, 2]. Так, при ожирении уровень лептина, который секретируется почти исключительно адипоцитами, значительно повышается [4], что может провоцировать возникновение окислительного стресса через стимуляцию окисления жирных кислот в митохондриях [6], активацию НАДФН-оксидазы (NOX) и индукцию продукции перекиси водорода (H₂O₂) и гидроксильных радикалов [10], а также стимулировать активацию моноцитов и макрофагов в жировой ткани [4].

Повышение продукции АФК в жировой ткани является одной из характеристик нарушения функции адипоцитов при их гипертрофии, способствует нарушению окислительно-восстановительного баланса и является одним из факторов формирования инсулинорезистентности [7, 8]. Вместе с тем показано, что значительное возрастание интенсивности наработки АФК в адипоцитах крыс, находившихся на диете с высоким содержанием сахарозы более 15 нед., было тесно связано с развитием гипергликемии [4].

Примечательно, что адипоциты, по-видимому, адаптируются к динамическим изменениям уровней АФК и используют их в качестве вторичных мессенджеров. Было обнаружено, что H₂O₂ имитирует действие инсулина: воздействие H₂O₂ на адипоциты приводило к быстрой транслокации переносчиков глюкозы и увеличению поглощения

глюкозы, усилению синтеза липидов [8]. Однако избыток АФК провоцирует окислительное повреждение молекулярных компонентов клеток, что приводит к перекисному окислению липидов и/или карбонилированию белков [17, 18]. Окислительная модификация белков преимущественно происходит путем прямого окисления аминокислот пролина, треонина, лизина и аргинина. Результаты исследований свидетельствуют о том, что окислительный стресс приводит к интенсивному окислению и карбонилированию многочисленных белков, опосредующих дисфункцию жировой ткани, включая FABP4 или GLUT4, что, вероятно, вызывает утрату их функциональной активности [17].

В реализованной нами модели МС убедительно показано, что ВЖВУД приводит к изменению физиологических и биохимических показателей, что находит свое отражение в избыточном накоплении жировой ткани, гипергликемии, инсулинемии, инсулинорезистентности, дислипидемии, лептинемии у животных экспериментальной группы. При этом, как нами установлено, повышение удельной массы жировой ткани взаимосвязано с увеличением концентрации глюкозы, лептина в сыворотке крови и уровня АФК в эпидидимальной жировой ткани животных с МС. Полученные результаты соотносятся с данными литературных источников, что служит подтверждением эффективности ВЖВУД для создания животных моделей МС [4, 9], а также подтверждает ее состоятельность для оценки про- и антиоксидантной активности жировой ткани.

Окислительный стресс, возникающий в жировой ткани, может быть обусловлен не только повышением продукции АФК, но и снижением антиоксидантной защиты адипоцитов. Так, у крыс, получавших высокоуглеводный корм, было зафиксировано снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, начиная с 3-й нед. эксперимента [4]. В клинических исследованиях было установлено, что экспрессия глутатионпероксидазы была значительно ниже в жировой ткани пациентов с сахарным диабетом 2-го типа по сравнению со здоровыми добровольцами [12]. Отмечается, что в жировой ткани мышей, содержащихся на ВЖВУД, концентрация фермента глутатион-S-трансферазы, участвующего в метаболизме прооксидантного альдегида 4-HNE, была снижена примерно в 3–4 раза вследствие карбонилирования [18].

Наряду с антиоксидантными ферментами важную роль в нейтрализации эндогенных АФК выполняет трипептид GSH [11, 19]. Антиоксидантная функция GSH в основном реализуется за счет реакций, катализируемых глутатионпероксидазой, которая восстанавливает H₂O₂ и гидроперекиси липидов по мере того, как GSH окисляется до GSSG, последний в свою очередь восстанавливается обратно до GSH глутатионредуктазой за счет НАДФН. Таким образом, важным показателем внутриклеточного редокс-баланса является отношение GSH к GSSG. При окислительном стрессе нарушается способность клеток восстанавливать GSSG до GSH, что приводит к накоплению GSSG и истощению запасов GSH [19].

В нашем исследовании было также установлено, что уровень общего глутатиона в жировой ткани крыс с ожирением снизился главным образом за счет уменьшения содержания GSH. Баланс GSH/GSSG сместился в сторону преобладания окисленной формы трипептида. Причем содержание общего глутатиона уменьшилось пропорционально увеличению уровня АФК в жировой ткани крыс, содержащихся в течение 12 нед. на ВЖВУД. Кроме того,

у животных опытной группы отмечалось снижение активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, но повышение глутатионредуктазной активности.

Подобное изменение редокс-баланса при МС может свидетельствовать о дисфункции и недостаточности нейтрализующего действия системы глутатиона при образующемся избытке АФК. Однако, несмотря на то, что большинство экспериментальных данных указывает на угнетение активности глутатион-зависимой антиоксидантной ферментативной системы, существуют сведения, что снижение функции глутатионпероксидазы и повышение экспрессии гамма-глутамилцистеин-синтетазы приводили к избыточному накоплению GSH в изолированных 3T3-L1 адипоцитах [20]. Равно как и у трансгенных мышей с гиперэкспрессией глутатионпероксидазы, отмечалось снижение чувствительности адипоцитов к инсулину [11].

Неоднозначность описанных в научной литературе эффектов антиоксидантных ферментов создает предпосылки для дальнейшей изучения их активности в различных тканях на фоне нарушений обмена веществ, характерных для данного синдрома.

Заключение

Ожирение как ключевой компонент МС является триггером для формирования инсулинорезистентности, хронического вялотекущего воспаления с системными проявлениями, в том числе за счет реакций окислительного стресса. В экспериментальной модели МС было исследовано функциональное состояние глутатион-зависимой антиоксидантной системы и ее роль в формировании метаболической дисфункции жировой ткани.

Установлено, что формирование МС и избыточное накопление висцерального жира у крыс на фоне ВЖВУД приводит к сдвигу окислительно-восстановительного баланса адипоцитов в сторону усиления их прооксидантной активности в совокупности с угнетением глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Учитывая высокую распространенность МС и возможные осложнения, необходимо углубленное изучение его патогенеза на клеточном и молекулярном уровнях с целью совершенствования способов профилактики и тактики лечения системных заболеваний, ассоциированных с кардиометаболическим риском.

Литература / References

1. Bremer A.A., Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J. Obes.* 2013;393192. DOI: 10.1155/2013/393192.
2. Lacobini C., Pugliese G., Blasetti Fantauzzi C., Federici M., Menini S. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism.* 2019;92:51–60. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.009.
3. Беспалова И.Д., Калюжин В.В., Мурашев Б.Ю., Осиков И.А., Кошачева Ю.И., Тетенева А.В. и др. Субпопуляционный состав и прооксидантная активность клеток висцеральной жировой ткани пациентов с метаболическим синдромом. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2022;37(3):114–120. [Bespalova I.D., Kalyuzhin V.V., Murashev B.Yu., Osikhov I.A., Koshchavtseva Y.I., Teteneva A.V. et al. Subpopulation composition and prooxidant activity of visceral adipose tissue cells in patients with metabolic syndrome. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2022;37(3):114–120. (In Russ.).] DOI: 10.29001/2073-8552-2022-37-3-114-120.
4. D'Alessandro M.E., Selensci D., Illesca P., Chicco A., Lombardo Y.B. Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. *Food Funct.* 2015;6(4):1299–1309. DOI: 10.1039/c4fo00903g.
5. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Boshchenko A.A., Popov S.V., Ivanov V.V., Oeltgen P.R. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? *J. Clin. Transl. Endocrinol.* 2018;15:1–5. DOI: 10.1016/j.jcte.2018.11.001.
6. Masschelin P.M., Cox A.R., Chernis N., Hartig S.M. The impact of oxidative stress on adipose tissue energy balance. *Front. Physiol.* 2020;10:1638. DOI: 10.3389/fphys.2019.01638.
7. Monserrat-Mesquida M., Quetglas-Llabrés M., Capó X., Bouzas C., Mateos D., Pons A. et al. Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants.* 2020;9(3):236. DOI: 10.3390/antiox9030236.
8. Castro J.P., Grune T., Speckmann B. The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. *Biol. Chem.* 2016;397(8):709–724. DOI: 10.1515/hsz-2015-0305.
9. Lasker S., Rahman M.M., Parvez F., Zamila M., Miah P., Nahar K. et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. *Sci. Rep.* 2019;9(1):20026. DOI: 10.1038/s41598-019-56538-0.
10. Taherkhani S., Suzuki K., Ruhee R.T. A brief overview of oxidative stress in adipose tissue with a therapeutic approach to taking antioxidant supplements. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(4):594. DOI: 10.3390/antiox10040594.
11. Picklo M.J., Long E.K., Vomhof-DeKrey E.E. Glutathionyl systems and metabolic dysfunction in obesity. *Nutrition Reviews.* 2015;73(12):858–868. DOI: 10.1093/nutrit/nuv042.
12. Langhardt J., Flehmig G., Klötting N., Lehmann S., Ebert T., Kern M. et al. Effects of weight loss on glutathione peroxidase 3 serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes. Facts.* 2018;11:475–490. DOI: 10.1159/000494295.
13. Shin S.K., Cho H.W., Song S.E., Im S.S., Bae J.H., Song D.K. Oxidative stress resulting from the removal of endogenous catalase induces obesity by promoting hyperplasia and hypertrophy of white adipocytes. *Redox Biol.* 2020;37:101749. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101749.
14. Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Быков В.В., Смаглий Л.В., Носарев А.В. и др. Экспериментальная модель метаболического синдрома у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты. *Бюллетень сибирской медицины.* 2020;19(4):14–20. [Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Bykov V.V., Smaglyi I.V., Nosarev A.V. et al. High-fat, high-carbohydrate diet-induced experimental model of metabolic syndrome in rats. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2020;19(4):14–20. (In Russ.).] DOI: 10.20538/1682-0363-2020-4-14-20.
15. Liu L., Zou P., Zheng L., Linarelli L. E., Amarel, S., Passaro A. et al. Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 2015;6(1):e1586. DOI: 10.1038/cddis.2014.553.
16. Rahman I., Kode A., Biswas S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006;1(6):3159–3165. DOI: 10.1038/nprot.2006.378.
17. Boden G., Homko C., Barrero C.A., Stein T.P., Chen X., Cheung P. et al. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Sci. Transl. Med.* 2015;7:1–10. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac4765.
18. Navarro-Ruiz M.C., Soler-Vázquez M.C., Díaz-Ruiz A., Peinado J.R., Nieto Calonge A., Sánchez-Ceinos J. et al. Influence of protein carbonylation on human adipose tissue dysfunction in obesity and insulin resistance. *Biomedicine.* 2022;10(12):3032. DOI: 10.3390/biomedicines10123032.
19. Lu S.C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830(5):3143–3153. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
20. Kobayashi H., Matsuda M., Fukuhara A., Komuro R., Shimomura I. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009;296(6):E1326–E1334. DOI: 10.1152/ajpendo.90921.2008.

Информация о вкладе авторов

Бирулина Ю.Г., Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна, написание рукописи.

Information on author contributions

Birulina J.G., Ivanov V.V. – research concept and design development, manuscript writing.

Буйко Е.Е. – экспериментальные исследования, статистическая обработка результатов.

Воронкова О.В. – анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы.

Buyko E.E. – experimental part, statistical data processing.

Voronkova O.V. – data interpretation and analysis, manuscript editing.

All authors gave their final consent to submit the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of the work.

Сведения об авторах

Бирулина Юлия Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-1237-9786.

E-mail: birulina20@yandex.ru.

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9348-4945.

E-mail: ivanovvv1953@gmail.com.

Буйко Евгений Евгеньевич, младший научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-6714-1938.

E-mail: buykoevgen@yandex.ru.

Воронкова Ольга Владимировна, д-р мед. наук, заведующий кафедрой биологии и генетики, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9478-3429.

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru.

 **Бирулина Юлия Георгиевна**, e-mail: birulina20@yandex.ru.

Information about the authors

Julia G. Birulina, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Division, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-1237-9786.

E-mail: birulina20@yandex.ru.

Vladimir V. Ivanov, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Center for Preclinical Research, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-9348-4945.

E-mail: ivanovvv1953@gmail.com.

Evgeny E. Buyko, Junior Research Scientist, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-6714-1938.

E-mail: buykoevgen@yandex.ru.

Olga V. Voronkova, Dr. Sci. (Med.), Head of Biology and Genetics Department, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-9478-3429.

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru.

 **Julia G. Birulina**, e-mail: birulina20@yandex.ru.

Received December 20, 2022

Поступила 20.12.2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-109>
УДК 57.085.23:611-018.6:615.841:577.175.722

Влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миоцитов в условиях гипергликемии

Е.Ю. Дьякова, А.Е. Черных, К.Г. Милованова, А.В. Чибалин, Л.В. Капилевич

Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 36

Аннотация

Проблемы исследования молекулярных механизмов патогенеза, инсулинорезистентности и поиска новых путей их коррекции по-прежнему остаются актуальными.

Цель: изучить влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миобластов мыши C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии.

Материал и методы. Изучалось влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миобластов мыши C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии. Клетки культивировались в среде, содержащей 25 мМ глюкозы и подвергались воздействию электроимпульсной стимуляции в течение 2, 6 и 24 ч.

Результаты. Показано, что культивирование миобластов C2C12 в среде с избытком глюкозы сопровождается снижением содержания pAkt в клетках, тогда как импульсная электростимуляция от 2 до 6 ч способствует увеличению содержания данного фермента и восстановлению чувствительности путей его фосфорилирования к воздействию инсулина.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что сократительная активность мышечных клеток способствует восстановлению чувствительности к инсулину и способности поглощать глюкозу, задействуя те же регуляторные и транспортные пути, которые страдают при развитии сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова:	миоциты, инсулинорезистентность, клеточная культура, электростимуляция.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 19-15-00118, https://rscf.ru/project/19-15-00118/ .
Соответствие принципам этики:	исследование было одобрено локальным этическим комитетом биологического института ТГУ (протокол № 32 от 02 декабря 2019 г.).
Для цитирования:	Дьякова Е.Ю., Черных А.Е., Милованова К.Г., Чибалин А.В., Капилевич Л.В. Влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миоцитов в условиях гипергликемии. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):106–109. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-109 .

Effect of electrical stimulation on the content of pAkt in myocyte cell culture under hyperglycemia

Elena Y. Dyakova, Anton E. Chernykh, Kseniya G. Milovanova,
Alexander V. Chibalin, Leonid V. Kapilevich

National Research Tomsk State University,
36, Lenin str., Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Introduction. The problems of studying the molecular mechanisms of pathogenesis, insulin resistance and finding new ways to correct them are still relevant.

Aim: To study the effect of electrical stimulation on the amount of pAkt in a cell culture of C2C12 mouse myoblasts cultivated under hyperglycemic conditions.

Material and Methods. We studied the effect of electrical stimulation on the amount of pAkt in a cell culture of C2C12 mouse myoblasts cultivated under hyperglycemic conditions. Cells were cultured in a medium containing 25 mM glucose and subjected to electrical impulse stimulation for 2, 6, and 24 hours.

Дьякова Елена Юрьевна, e-mail: adyakova@yandex.ru.

Results. It has been shown that the cultivation of C2C12 myoblasts in a medium with excess glucose is accompanied by a decrease in the amount of pAkt in cells, while pulsed electrical stimulation from 2 to 6 hours increases the concentration of this enzyme and restores the sensitivity of its phosphorylation pathways to insulin.

Conclusions. The results obtained suggest that the contractile activity of muscle cells contributes to the restoration of cell sensitivity to insulin and the ability to absorb glucose, using the same regulatory and transport pathways that are affected in the development of type 2 diabetes.

Keywords:	myocytes, insulin resistance, cell culture, electrical stimulation.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	the reported study was funded by RSF according to the research project No. 19-15-00118, https://rscf.ru/project/19-15-00118/ .
Adherence to ethical standards:	the study was approved by the local ethics committee of the TSU Biological Institute (protocol No. 32 dated December 02, 2019).
For citation:	Dyakova E.Y., Chernykh A.E., Milovanova K.G., Chibalin A.V., Kapilevich L.V. Effect of electrical stimulation on the content of pAkt in myocyte cell culture under hyperglycemia. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):106–109. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-106-1009 .

Введение

Проблемы исследования молекулярных механизмов патогенеза, инсулинорезистентности и поиска новых путей их коррекции по-прежнему остаются актуальными, так как эти состояния оказывают существенное влияние на качество и продолжительность жизни человека, во многом определяют процессы здорового старения и работоспособности в старшем возрасте [1]. Особый интерес вызывают позитивные эффекты физических нагрузок, которые способствуют снижению инсулинорезистентности и восстановлению способности мышечных клеток утилизировать глюкозу [2]. Однако механизмы реализации этого эффекта до настоящего времени остаются дискуссионными. Перспективным путем их изучения являются эксперименты на клеточных культурах [3, 4].

Цель: изучить влияние электростимуляции на содержание pAkt в клеточной культуре миобластов мыши C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии.

Материал и методы

Работа выполнялась на клеточной культуре миобластов мыши C2C12 (источник – коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки высевались с плотностью 3×10^4 клеток/лунку в 16 шестиугольных планшетов, содержащих среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), с добавлением 5 мМ глюкозы, 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и хранили при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Через 3–5 дней после посева, когда клетки достигали 70–80% конфлюэнтности, они подвергались дифференцировке в среде DMEM, содержащей 5 мМ глюкозы, антибиотики, 2% телячью сыворотку и 1 нМ инсулин. Среду дифференцировки меняли ежедневно. Морфологию клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении $\times 400$ без предварительной фиксации.

После окончания дифференцировки планшеты с клетками случайным образом разделялись на две группы – экспериментальную (ЭГ, 48 лунок) и контрольную (КГ, 48 лунок). В планшетах ЭГ заменяли дифференцировочную среду с 5,5 мМ глюкозы на среду, содержащую 25 мМ глюкозы. В планшетах КГ в среду с 5,5 мМ глюкозы до-

бавляли маннитол для уравнивания осмолярности. Клетки помещались на 2 дня в инкубатор.

Далее клетки подвергали электростимуляции (которую мы рассматривали как моделирование физической нагрузки). Для того чтобы привести все клетки к состоянию базальной активности, в каждой группе проводили метод serum starvation – сывороточное голодание [5]. Для этого клетки на 1 ч помещались в среду, не содержащую сыворотки, после этого среда заменялась на сывороточную.

Каждая группа разделялась на 4 подгруппы по 12 лунок. Одна подгруппа в каждой группе оставалась интактной, а три – подвергались воздействию электроимпульсной стимуляции в течение 2, 6 и 24 ч соответственно. Электроимпульсная стимуляция выполнялась с использованием генератора импульсов C-Pace (C-Pace EP, IonOptix, США) с напряжением 40 В, длительностью стимулов 10 мс и частотой 1 Гц.

Сразу после завершения электростимуляции в 6 лунок в каждой подгруппе добавляли 10 нМ инсулина, а в 6 лунок – аналогичное количество сыворотки, после чего планшеты помещали в инкубатор на 30 мин, затем клетки промывали PBS и замораживали в жидком азоте. Материал хранили в морозильной камере при температуре –80 °С.

Клеточные лизаты получали солиubilизацией клеточных преципитатов в 1 х PBS (pH 7,4) и повторным замораживанием и плавлением. Концентрацию белка определяли с помощью метода Лоури. Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле проводили в соответствии с методом Лэммли с 5% стекирующим гелем и 12% бегущим гелем. Белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) с последующим блокированием 5% сухим молоком (Valio, Финляндия) в 1 х PBST (PBS с добавлением Tween 20 0,1%) в течение 1 ч при комнатной температуре. Обнаружение скелетного тропонина-Т с использованием инкубации в течение ночи с 10 мкг/мл антител к тропонину-Т каждое при 4 °С в 5% сухом молоке в PBST. Инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с HRP, проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в 5% сухом молоке в PBST. Визуализацию комплексов антиген-антитело осуществляли с помощью набора ECL и ChemiDoc XRS + Molecular Imager (BioRad, США).

Для контроля состояния глюкозотранспортирующих систем определяли содержание фосфорилированной

формы протеинкиназы pAkt. Определение выполняли методом вестерн-блот с применением специфических антител anti-pAkt (ser427).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 8.0. Нормальность распределения показателя в сравниваемых группах оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Так как гипотеза о нормальности распределения показателей не подтверждалась, концентрации белка pAkt в подгруппах представлены медианами (Me) и межквартильными интервалами (Q_1 ; Q_3), а для проверки гипотезы об отсутствии различий в независимых подгруппах использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Биологического института ТГУ (протокол № 32 от 02 декабря 2019 г.).

Результаты

Белок pAkt обнаруживался во всех исследуемых образцах. В ЭГ его содержание было ниже, чем в КГ. Добавление инсулина приводило к достоверному увеличению содержания pAkt в обеих группах, однако в КГ прирост был значительно выше, чем в ЭГ (таблица). Очевидно, что в данной модели инсулинорезистентность формируется лишь частично.

После 2-часовой электроимпульсной стимуляции наблюдалось некоторое увеличение содержания pAkt в обеих группах. После добавления инсулина прирост фосфорилированной формы фермента был выше, чем в подгруппе без стимуляции, особенно существенный прирост отмечался в ЭГ. После 6-часовой электроимпульсной стимуляции прирост содержания pAkt был более выражен, чем после 2 ч. Однако после 24-часовой электроимпульсной стимуляции мы наблюдали значительное снижение прироста содержания pAkt во всех подгруппах клеток. Возрастание содержания pAkt при добавлении инсулина наблюдалось и в ЭГ, и в КГ в равной степени.

Таблица. Содержание pAkt в образцах гомогенизированных миоцитов после воздействия электростимуляции

Table. pAkt content in samples of homogenized myocytes after electrical stimulation

Стимуляция Stimulation	Предобработка Pretreatment	Группы (Groups) Me (Q_1 ; Q_3)	
		Контрольная Control	Экспериментальная Experimental
Без стимуляции Without stimulation	Интактные Intact	261 (229; 295)	155 (127; 179)*
	Инсулин Insulin	1512 (1458; 1577)#	692 (655; 738)#
2 ч (2 hours)	Интактные Intact	499 (462; 439)	611 (668; 741)*
	Инсулин Insulin	1855 (1764; 1929)#	1452 (1399; 1507)#

Литература / References

- Cloete L. Diabetes mellitus: an overview of the types, symptoms, complications and management. *Nurs. Stand.* 2022;37(1):61–66. DOI: 10.7748/ns.2021.e11709.
- Gabriel B.M., Zierath J.R. The limits of exercise physiology: from per-

Окончание табл.
End of table

Стимуляция Stimulation	Предобработка Pretreatment	Группы (Groups) Me (Q_1 ; Q_3)	
		Контрольная Control	Экспериментальная Experimental
6 ч (6 hours)	Интактные Intact	611 (571; 559)	799 (755; 8420)*
	Инсулин Insulin	2145 (2033; 2227)#	2120 (2048; 2204)#
24 ч (24 hours)	Интактные Intact	428 (381; 484)	497 (448; 562)
	Инсулин Insulin	1045 (989; 1112)#	981 (931; 1039)#

Примечание: * – достоверность различий между экспериментальной и контрольной группой, $p < 0,05$; # – достоверность различий между интактными клетками и клетками, стимулированными инсулином, $p < 0,05$.

Note: * – significance of differences between the experimental and control groups, $p < 0.05$; # – significance of differences between intact cells and cells stimulated by insulin, $p < 0.05$.

Таким образом, культивирование миоцитов C2C12 в среде с избытком глюкозы сопровождается снижением содержания p-Akt в клетках, тогда как импульсная электростимуляция от 2 до 6 ч способствует увеличению содержания данного фермента и восстановлению чувствительности путей его фосфорилирования к воздействию инсулина.

Обсуждение

Akt представляет собой серин- или треонинкиназу. Akt играет решающую роль в развитии инсулинорезистентности мышечной и жировой ткани, регулируя стимулированный инсулином перенос GLUT4, изменения активности Akt обнаруживаются в различных клетках при диабете и инсулинорезистентности. Фосфорилирование Akt снижается в адипоцитах и скелетных мышцах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. В адипоцитах активация Akt2 тесно коррелирует с транслокацией GLUT4 посредством активирования инсулином [6, 7]. У мышей с нокаутом Akt2 или Akt3, но не Akt1, развивается диабет с гипергликемией, гиперинсулинемией, нарушениями транспорта и поглощения глюкозы в мышцах [6].

Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что сократительная активность мышечных клеток способствует восстановлению чувствительности клеток к инсулину и способности поглощать глюкозу, задействуя те же регуляторные и транспортные пути, которые страдают при развитии сахарного диабета 2-го типа. Эти данные могут быть особенно полезны в широкой области исследований молекулярного механизма поглощения глюкозы миоцитами, резистентности к инсулину, диабета и ожирения.

formance to health. *Cell Metab.* 2017;25(5):1000–1011. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.04.018.

- Luo W., Ai L., Wang B.F., Zhou Y. High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling. *Biomed. Pharmacother.* 2019;120:109498. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109498.
- Zhang L., Wang J., Zhao Y.T., Dubielecka P., Qin G., Zhuang S. et al.

- Deletion of PRAK Mitigates the Mitochondria Function and Suppresses Insulin Signaling in C2C12 Myoblasts Exposed to High Glucose. *Front. Pharmacol.* 2021;12:698714. DOI: 10.3389/fphar.2021.698714.
5. Pirkmajer S., Chibalin A.V. Serum starvation: caveat emptor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011;301(2):272–279. DOI: 10.1152/ajpcell.00091.2011.
6. Kim B., Feldman E.L. Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012;23(3):133–141. DOI: 10.1016/j.tem.2011.12.004.
7. Kang S., Kim C.-H., Jung H., Kim E., Song H.-T., Lee J.E. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signaling. *Neuropharmacology.* 2017;113(Part A):467–479. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.029.

Информация о вкладе авторов

Дьякова Е.Ю. участвовала в разработке общей концепции и дизайна исследования, проведении исследования, получении, анализе и интерпретации данных, написала первую версию рукописи, подготовила ее для публикации.

Черных А.Е. участвовал в проведении исследования, получении, анализе и интерпретации данных.

Милованова К.Г. участвовала в разработке общей концепции и дизайна исследования, проведении исследования, получении, анализе и интерпретации данных.

Чибалин А.В. участвовал в создании концепции и дизайна исследования, внес вклад в доработку исходного варианта рукописи.

Капилевич Л.В. участвовал в создании концепции и дизайна исследования, внес вклад в доработку исходного варианта рукописи.

Information on author contributions

Dyakova E.Y. – contribution to the development of the general concept and design of the study; study completion; data generation, analysis, and interpretation; writing the first version of the manuscript; and preparation of the manuscript for publication.

Chernykh A.E. – participation in the study, data obtaining, analyzing and interpreting.

Milovanova K.G. – contribution to the development of the general concept and design of the study; study completion; data generation, analysis, and interpretation.

Chibalin A.V. – participation in concept development and design of the study and contribution to the revision of the manuscript original version.

Kapilevich L.V. – participation in concept development and design of the study and contribution to the revision of the manuscript original version.

Сведения об авторах

Дьякова Елена Юрьевна, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0001-7653-2386.

E-mail: adyakova@yandex.ru.

Черных Антон Евгеньевич, студент, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-6802-4987.

E-mail: anthonyairblack@gmail.com.

Милованова Ксения Геннадьевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-3038-3298.

E-mail: naffys@mail.ru.

Чибалин Александр Валерьевич, канд. мед. наук, доцент кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-6339-6271.

E-mail: alexander.chibalin@ki.se.

Капилевич Леонид Владимирович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, факультет физической культуры, Национальный исследовательский Томский государственный университет. ORCID 0000-0002-2316-576X.

E-mail: kapil@yandex.ru.

Information about the authors

Elena Y. Dyakova, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0001-7653-2386.

E-mail: adyakova@yandex.ru.

Anton E. Chernykh, Student, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-6802-4987.

E-mail: anthonyairblack@gmail.com.

Kseniya G. Milovanova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-3038-3298.

E-mail: naffys@mail.ru.

Alexander V. Chibalin, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-6339-6271.

E-mail: alexander.chibalin@ki.se.

Leonid V. Kapilevich, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Sports and Health Tourism, Sports Physiology and Medicine, Faculty of Physical Education, National Research Tomsk State University. ORCID 0000-0002-2316-576X.

E-mail: kapil@yandex.ru.

 **Elena Y. Dyakova**, e-mail: adyakova@yandex.ru.

Received October 21, 2022

 **Дьякова Елена Юрьевна**, e-mail: adyakova@yandex.ru.

Поступила 21.10.2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-110-117>
УДК 616.127-005.8-06:616.12-004:612.172]-092.9

Инотропная реакция миокарда крыс разного возраста на экстрасистолические воздействия при постинфарктном кардиосклерозе

Т.Ю. Реброва, Д.С. Кондратьева, С.А. Афанасьев, М.О. Островик,
С.В. Попов

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Цель: исследовать инотропную реакцию изолированных полосок папиллярных мышц из сердец крыс в возрасте 4, 12 и 24 мес. на экстрасистолические воздействия при постинфарктном кардиосклерозе (ПИКС).

Материал и методы. Исследовали возраст-зависимые особенности инотропного ответа изолированных полосок папиллярных мышц крыс при ПИКС. Оценивали ритмо-инотропную реакцию миокарда на экстрасистолические воздействия у ложнооперированных (ЛО) крыс и крыс со сформировавшимся ПИКС в возрастных группах 4, 12 и 24 мес. Показано, что возбудимость саркоплазматической мембраны кардиомиоцитов увеличивается у 12-месячных ЛО животных и снижается у 24-месячных относительно группы 4-месячных ЛО животных. Способность саркоплазматического ретикулума (СПР) кардиомиоцитов аккумулировать ионы кальция (Ca^{2+}) не зависит от возраста. Постинфарктное ремоделирование миокарда сопровождается снижением возбудимости сарколеммы у 4-месячных животных и повышением у 24-месячных особей относительно значений у ЛО крыс соответствующего возраста. При этом Ca^{2+} -аккумулирующая способность СПР снижается у 4- и 12-месячных животных, оставаясь неизменной у 24-месячных особей.

Ключевые слова:	постинфарктный кардиосклероз, возраст, экстрасистолический тест, саркоплазматический ретикулум, крысы.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Соответствие принципам этики:	все манипуляции с животными осуществляли, руководствуясь положениями приказа Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (№ 192 от 18.12.2019 г.).
Для цитирования:	Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Островик М.О., Попов С.В. Инотропная реакция миокарда крыс разного возраста на экстрасистолические воздействия при постинфарктном кардиосклерозе. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):110–117. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-110-117 .

Myocardial inotropic response of rats of different ages to extrasystolic exposures in postinfarction cardiosclerosis

Tatiana Yu. Rebrova, Dina S. Kondratieva, Sergey A. Afanasiev,
Margarita O. Ostrovik, Sergey V. Popov

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Abstract

The age-dependent features of the inotropic response of isolated strips of rat papillary muscles in postinfarction cardiosclerosis were studied. The rhythmic-inotropic response of the myocardium to extrasystolic effects was assessed in sham-operated

Реброва Татьяна Юрьевна, e-mail: rebrova@cardio-tomsk.ru.

(SO) rats and rats with established post-infarction cardiosclerosis (PICS) in the age groups of 4, 12, and 24 months (mon). It was shown that the excitability of the sarcoplasmic membrane of cardiomyocytes increases in 12-mon-old SO animals, and decreases in 24-mon-old animals relative to the group of 4-mon-old SO animals. The ability of the sarcoplasmic reticulum (SPR) of cardiomyocytes to accumulate calcium ions (Ca^{2+}) does not depend on age. Postinfarction myocardial remodeling is accompanied by a decrease in the excitability of the sarcolemma in 4-mon-old animals and an increase in 24-mon-old animals relative to the values in SO rats of the corresponding age. At the same time, the Ca^{2+} -accumulating ability of the SBP decreases in 4- and 12-mon-old animals, remaining unchanged in 24-mon-old animals.

Keywords:	postinfarction cardiosclerosis, age, extrasystolic test, sarcoplasmic reticulum, rats.
Conflict of interest:	the authors have no conflicts of interest to declare
Financial disclosure:	none of the authors has a financial interest in the presented materials or methods.
Adherence to ethical standards:	all manipulations with animals were carried out in accordance with the provisions of the order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 01.04.2016 N. 199n "On approval of the rules of good laboratory practice". The study protocol was approved by the local ethics committee of the Research Institute of Cardiology of the Tomsk National Research Medical Center (No. 192 dated 18.12.2019).
For citation:	Rebrova T.Yu., Kondratieva D.S., Afanasiev S.A., Ostrovik M.O., Popov S.V. Myocardial inotropic response of rats of different ages to extrasystolic exposures in postinfarction cardiosclerosis. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):110–117. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-110-117..

Введение

Хорошо известно, что процесс старения живых организмов характеризуется нарастанием дестабилизации функций и биологических процессов в жизненно важных органах, в том числе в сердечно-сосудистой системе [1, 2]. Формированию возраст-зависимого снижения сократительной активности сердечной мышцы способствуют сдвиги в нейрогуморальной регуляции сердца [3–6], модификация межклеточного матрикса [7] и снижение активности компонентов внутриклеточного сократительного аппарата кардиомиоцитов [1]. Инотропный ответ сердечной мышцы является результатом реализации на уровне отдельных кардиомиоцитов процесса электро-механического сопряжения [8]. Именно здесь определяется особенность проявления хроноинотропной зависимости и закона Франка – Старлинга, обеспечивающих способность сердца эффективно реагировать на внешние воздействия.

В настоящее время в большинстве стран отмечается старение населения. Указанная тенденция особенно актуальна для России, где рост доли лиц старшего возраста опережает рост численности населения в целом. Процессы старения могут выступать фактором, способствующим клинической манифестации болезней. Среди возрастных патологий первое место принадлежит заболеваниям сердечно-сосудистой системы, в частности ишемической болезни сердца с развившейся хронической сердечной недостаточностью. В этой связи является актуальным изучение фундаментальных механизмов изменений электро-механического сопряжения в сердечной мышце при старении организма и их реализации в условиях хронической ишемии при кардиосклерозе. Показано, что постинфарктное ремоделирование сердца приводит к изменению геометрии его полостей, ротационных и контрактильных свойств миокарда [9–11].

Цель работы: исследование инотропной реакции изолированных полосок папиллярных мышц из сердец крыс в возрасте 4, 12 и 24 мес. на экстрасистолические воздействия при постинфарктном кардиосклерозе (ПИКС).

Материал и методы

Исследования были выполнены на 60 самцах крыс линии Wistar трех возрастных групп, включавших по 10 ложнооперированных (ЛО) и 10 опытных животных в каждой. Первую возрастную группу составили 4-месячные крысы массой 200–250 г. Вторую – 12-месячные особи массой 350–400 г, третью – 24-месячные животные массой 450–510 г.

Все манипуляции с животными осуществляли, руководствуясь положениями приказа Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (№ 192 от 18.12.2019 г.)

Опытным животным в каждой возрастной группе моделировали инфаркт миокарда, выполняя коронаро-окклюзию в области верхней трети левой коронарной артерии [12]. ЛО животным были выполнены все операционные процедуры, исключая наложение лигатуры на коронарную артерию. Операции проводили в асептических условиях с использованием общего обезболивания путем однократного внутримышечного введения Zoletil (Virbac) (тилетамина + золазепам) в дозировке 20–40 мг/кг. Прооперированных животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Формирование ПИКС происходило в течение 42 сут после коронароокклюзии [12, 13]. По истечении этого срока животных брали в дальнейшее исследование. Крыс обездвигивали дислокацией шейного отдела позвоночника, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце. Выделенное сердце помещали в охлажденный физиологический раствор Кребса – Хензеляйта (pH = 7,4) следующего состава (в мМ): NaCl – 120; KCl – 4,8; $CaCl_2$ – 2,0; $MgSO_4$ – 1,2; KH_2PO_4 – 1,2; $NaHCO_3$ – 20,0; глюкоза – 10,0 (Sigma). Полости сердца и коронарные сосуды промывали через аорту в специализированной проточной камере. Из левого желудочка выделяли папиллярные мышцы, из которых готовили мышечные полоски с поперечным сечением

0,5–0,7 мм и длиной 5 мм. Размер мышц определяли с помощью объект-микрометра. Подготовленные мышечные полоски размещали в термостабилизированной (36 °С) проточной камере установки для изучения сократительной активности мышечных препаратов (Scientific Instruments GmbH, Германия). В течение 60 мин мышечную полоску адаптировали к условиям перфузии и изометрическому режиму сокращения. Для перфузии использовали оксигенированный (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) раствор Кребса – Хензеляйта. Стимуляцию мышечных полосок осуществляли электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 5 мс при базовой частоте импульсов 0,5 Гц. Кривые одиночного цикла сокращения-расслабления мышечных полосок регистрировали и обрабатывали при помощи программы MUSCLEDATA (Scientific Instruments GmbH, Германия). Напряжение, развиваемое мышечной полоской, оценивали в пересчете на площадь ее поперечного сечения (mN/mm^2).

Проведение электрофизиологических тестов на изолированных мышечных полосках миокарда, в том числе и экстрасистолического, позволяет оценить возбудимость сарколеммы и состоятельность саркоплазматического ретикулума как основного внутриклеточного депо ионов кальция (Ca^{2+}) [14]. Обе эти структуры участвуют в обеспечении осцилляций Ca^{2+} в кардиомиоцитах [15, 16]. Проведение экстрасистолического теста заключается в нанесении одиночного внеочередного стимулирующего электрического импульса (экстрасистолическое воздействие). Экстрасистолическое воздействие оказывали через 0,2; 0,225; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 с (экстрасистолические интервалы – ЭСИ) после начала регулярного цикла сокращения-расслабления, используя электрический импульс с теми же характеристиками, как и для базовой стимуляции [11, 17]. На кривых сокращения-расслабления измеряли амплитуду экстрасистолического (ЭС) и постэкстрасистолического (ПЭС) сокращений (рис. 1). Амплитуду регулярного цикла принимали за 100%. В каждом случае амплитуду ЭС и ПЭС сокращения выражали в процентах к регулярному циклу. Амплитуда ЭС сокращения и длительность ЭСИ, на котором это сокращение регистрируется впервые, отражает возбудимость сарколеммы кардиомиоцитов. Амплитуда ПЭС сокращения характеризует способность саркоплазматического ретикулума (СР) кардиомиоцитов аккумулировать ионы

Ca^{2+} , дополнительно поступающие в миоплазму при экстрасистолическом возбуждении [11, 14].

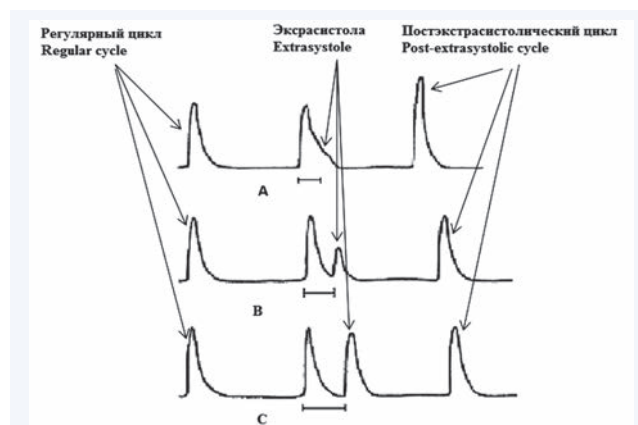


Рис. 1. Типичный вид механограмм после выполнения экстрасистолического теста

Примечание: А – экстрасистолическое воздействие с интервалом 0,2 с, Б – экстрасистолическое воздействие с интервалом 0,5 с, С – экстрасистолическое воздействие с интервалом 1,0 с.

Fig. 1. A typical view of mechanograms after performing an extrasystolic test
Note: A – extrasystolic impact with an interval of 0.2 s, B – extrasystolic impact with an interval of 0.5 s, C – extrasystolic impact with an interval of 1.0 s.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0. Проверку гипотезы нормального распределения показателей выполняли с использованием теста Шапиро – Уилка. Количественные данные соответствовали нормальному закону распределения. Значимость различий в независимых выборках оценивали с применением двустороннего t -критерия Стьюдента. Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, где M – среднее значение показателя, SEM – стандартная ошибка среднего.

Результаты

Выполнение ЭС теста на изолированных полосках папиллярных мышц из миокарда ЛО крыс 4-месячного возраста позволило получить первый ЭС инотропный ответ при ЭСИ длительностью 0,225 с (табл. 1).

Таблица 1. Амплитуда экстрасистолического сокращения мышечных полосок отпрепарированных из папиллярных мышц левого желудочка сердца 4-, 12- и 24-месячных крыс (процент к регулярному циклу) ($M \pm SEM$)

Table 1. Amplitude of extrasystolic contraction of muscle strips prepared from the papillary muscles of the left ventricle of the heart of 4, 12, and 24-month-old rats (percentage of the regular cycle) ($M \pm SEM$)

Экстрасистолический интервал Extrasystolic interval	Группы животных Animal groups					
	4-месячные 4-month-old		12-месячные 12-month-old		24-месячные 24-month-old	
	ЛО, группа 1 (n = 10) SO, group 1 (n = 10)	ПИКС, группа 2 (n = 10) PICS, group 2 (n = 10)	ЛО, группа 3 (n = 10) SO, group 3 (n = 10)	ПИКС, группа 4 (n = 10) PICS, group 4 (n = 10)	ЛО, группа 5 (n = 10) SO, group 5 (n = 10)	ПИКС, группа 6 (n = 10) PICS, group 6 (n = 10)
0,20 с	–	–	41,25 ± 2,31	38,39 ± 4,22	–	19,23 ± 4,04 $p_{6-4} < 0,05$
0,225 с	23,74 ± 1,47	–	44,65 ± 1,71 $p_{3-1} < 0,05$	37,51 ± 5,88	19,74 ± 3,11 $p_{5-3} < 0,05$	20,35 ± 2,49 $p_{6-4} < 0,001$
0,25 с	31,11 ± 2,48	42,53 ± 4,89	48,42 ± 1,11 $p_{3-1} < 0,05$	42,41 ± 4,27	38,46 ± 7,81	23,56 ± 3,94 $p_{6-4} < 0,05$

Окончание табл. 1
 End of table 1

Экстрасистолический интервал Extrasystolic interval	Группы животных Animal groups					
	4-месячные 4-month-old		12-месячные 12-month-old		24-месячные 24-month-old	
	ЛО, группа 1 (n = 10) SO, group 1 (n = 10)	ПИКС, группа 2 (n = 10) PICS, group 2 (n = 10)	ЛО, группа 3 (n = 10) SO, group 3 (n = 10)	ПИКС, группа 4 (n = 10) PICS, group 4 (n = 10)	ЛО, группа 5 (n = 10) SO, group 5 (n = 10)	ПИКС, группа 6 (n = 10) PICS, group 6 (n = 10)
0,5 с	50,34 ± 1,88	63,71 ± 3,15	58,67 ± 3,71	53,22 ± 3,59	51,37 ± 4,90	43,75 ± 4,96 $p_{6-2} < 0,05$ $p_{6-4} < 0,05$
0,75 с	58,55 ± 1,78	72,02 ± 4,42 $p_{2-1} < 0,05$	66,52 ± 2,88	63,98 ± 2,91	63,72 ± 4,82	57,34 ± 5,76
1,0 с	65,55 ± 1,18	73,14 ± 2,81 $p_{2-1} < 0,05$	70,84 ± 4,61	69,34 ± 3,35	68,45 ± 3,71	62,89 ± 5,27
1,25 с	69,34 ± 2,14	74,91 ± 4,97	72,91 ± 2,67	75,35 ± 3,15	73,23 ± 4,69	65,46 ± 5,79
1,5 с	71,41 ± 1,08	82,86 ± 4,28 $p_{2-1} < 0,05$	73,19 ± 2,67	75,28 ± 2,88	72,87 ± 4,82	58,21 ± 5,13 $p_{6-2} < 0,05$ $p_{6-4} < 0,05$ $p_{6-5} < 0,05$

Примечание: p_{ij} – уровень значимости различий между показателями в i и j группах, $i = 1..5$, $j = 2..6$, $i \neq j$, n – количество животных в группе.

Note: p_{ij} – significance level of differences between indicators in i and j groups, $i = 1..5$, $j = 2..6$, $i \neq j$, n – the number of animals in the group.

Амплитуда этого ответа составила 23,7% от амплитуды регулярного сокращения. В группе ЛО 12-месячных животных ЭС инотропный ответ был получен уже при ЭСИ длительностью 0,2 с, амплитуда ответа составила 41,3% от регулярного сокращения. При этом амплитуда ЭС ответа при длительности ЭСИ 0,225 с и 0,25 с была значимо выше ($p < 0,05$ в обоих случаях), чем в группе 4-месячных крыс. Результаты ЭС теста в группах ЛО животных в возрасте 4 и 12 мес. значимо не отличались от ранее полученных на папиллярных мышцах интактных крыс аналогичных возрастных групп [17]. При проведении ЭС теста в группе ЛО 24-месячных животных, первый инотропный ответ был получен при ЭСИ длительностью 0,225 с. В этой группе амплитуда ЭС сокращения не отличалась от аналогичных значений у крыс 4-месячного возраста (см. табл. 1). При нанесении ЭС стимулов на более длительные ЭСИ полоски папиллярных мышц ЛО животных всех возрастных групп отвечали увеличением амплитуды ЭС сокращения. Амплитуда ЭС сокращения изолированных полосок папиллярных мышц ЛО животных на ЭСИ длительностью 1,5 с была одинаковой во всех возрастных группах. Однако динамика прироста амплитуды при увеличении длительности ЭСИ была различной. В группах 4- и 24-месячных крыс ЭС сокращения появлялись на интервале 0,225 с, их амплитуда динамично нарастала и на интервале длительностью 1,5 с превысила первоначальные показатели в группе в 3,0 и 3,7 раза соответственно. В группе 12-месячных животных прирост амплитуды ЭС сокращения при ЭСИ длительностью 1,5 с был менее выражен и составил 1,6 раза.

Выполнение ЭС теста в группах животных с ПИКС выявило значимые возрастные различия на коротких ЭСИ. В группе 4-месячных крыс с ПИКС первый ЭС ответ развивался при более длительном ЭСИ, чем в группе ЛО животных соответствующего возраста (см. табл. 1). В этой группе, начиная с ЭСИ длительностью 0,75 с и более, было отмечено значимое превышение ампли-

туды ЭС ответа над показателями, полученными у ЛО крыс этого возраста. В группе 12-месячных крыс с ПИКС ответ изолированных полосок папиллярных мышц на ЭС воздействия значимо не отличался от показателей в группе ЛО животных этого возраста. У 24-месячных крыс с ПИКС первый ЭС ответ был получен на более коротком ЭСИ (0,20 с) по сравнению с ЛО возрастным контролем. Но при этом на всех ЭСИ амплитуда инотропного ответа миокарда 24-месячных крыс с ПИКС была значимо ниже, чем в группе 12-месячных и не отличалась от показателей в группе 4-месячных животных с ПИКС.

В таблице 2 представлены результаты статистической обработки результатов ПЭС сокращений изолированных полосок папиллярных мышц крыс экспериментальных групп. В группах ЛО крыс в возрасте 4 и 24 мес. прирост амплитуды ПЭС сокращений на 39,3 и 26,9% соответственно был получен при ЭСИ длительностью 0,2 с. Практически такое же увеличение амплитуды ПЭС сокращений было получено у ЛО 12-месячных крыс, имеющих на этом интервале выраженный ЭС инотропный ответ. В нашем исследовании не было отмечено принципиальных межгрупповых различий по величине ПЭС сокращений между группами ЛО животных разного возраста. Во всех возрастных группах с увеличением времени ЭСИ отмечалось уменьшение амплитуды ПЭС сокращений.

Сформировавшийся ПИКС существенно повлиял на выраженность ПЭС сокращений, особенно при длительности ЭСИ менее 0,5 с. Так, уже при ЭСИ длительностью 0,2 с прирост амплитуды ПЭС сокращений был меньше, чем в группах ЛО крыс. При этом у 4- и 12-месячных крыс это различие было статистически значимым. Это обусловлено, с одной стороны, меньшими значениями ПЭС сокращений у ЛО животных старших возрастных групп в сравнении с аналогичным показателем у 4-месячных крыс, а с другой стороны, большим приростом амплитуды ПЭС в подгруппах с ПИКС.

Таблица 2. Амплитуда постэкстрасистолического сокращения мышечных полосок отпрепарированных из папиллярных мышц левого желудочка сердец 4-, 12- и 24-месячных крыс (процент к регулярному циклу) ($M \pm SEM$)

Table 2. Amplitude of post-extrasystolic contraction of muscle strips prepared from the papillary muscles of the left ventricle of the hearts of 4, 12, and 24-month-old rats (percentage of the regular cycle) ($M \pm SEM$)

Экстра-систолический интервал Extra systolic interval	Группы животных Animal groups					
	4-месячные 4-month-old		4-месячные 4-month-old		4-месячные 4-month-old	
	ЛО, группа 1 ($n = 10$) SO, group 1 ($n = 10$)	ПИКС, группа 2 ($n = 10$) PICS, group 2 ($n = 10$)	ЛО, группа 3 ($n = 10$) SO, group 3 ($n = 10$)	ПИКС, группа 4 ($n = 10$) PICS, group 4 ($n = 10$)	ЛО, группа 5 ($n = 10$) SO, group 5 ($n = 10$)	ПИКС, группа 6 ($n = 10$) PICS, group 6 ($n = 10$)
0,2 с	139,3 ± 3,4	106,9 ± 3,3 $p_{2-1} < 0,05$	132,6 ± 4,5	115,1 ± 4,9 $p_{4-3} < 0,05$	126,9 ± 4,0	113,4 ± 4,8
0,225 с	140,6 ± 2,7	113,7 ± 3,0 $p_{2-1} < 0,05$	146,7 ± 3,5	122,1 ± 3,9 $p_{4-2} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,05$	120,1 ± 6,2	120,6 ± 5,6
0,25 с	128,4 ± 2,1	106,4 ± 4,6	131,5 ± 4,6	120,6 ± 4,6 $p_{4-2} < 0,05$	119,2 ± 5,9	121,8 ± 5,8
0,5 с	110,9 ± 1,1	113,9 ± 5,6	111,9 ± 2,8	111,8 ± 3,3	104,6 ± 3,7	108,3 ± 3,5
0,75 с	106,3 ± 1,5	107,9 ± 2,9	102,6 ± 2,7	108,9 ± 2,6	103,5 ± 2,6	104,0 ± 3,7
1,0 с	101,2 ± 1,8	99,4 ± 2,4	100,9 ± 1,4	105,2 ± 2,1	99,2 ± 2,7	99,8 ± 3,5
1,25 с	90,5 ± 5,8	100,3 ± 5,5	96,5 ± 1,4	103,1 ± 1,9	98,2 ± 2,6	94,4 ± 2,6
1,50 с	97,8 ± 1,61	87,9 ± 4,8	94,9 ± 1,8	104,2 ± 1,9	103,4 ± 2,2	93,9 ± 4,3

Примечание: p_{ij} – уровень значимости различий между показателями в i и j группах, $i = 1..5$, $j = 2..6$, $i \neq j$, n – количество животных в группе.

Note: p_{ij} – significance level of differences between indicators in i and j groups, $i = 1..5$, $j = 2..6$, $i \neq j$, n – the number of animals in the group.

Наименьшие различия между значениями амплитуды ПЭС сокращений в группах ЛО и ПИКС наблюдались у 24-месячных крыс. Следует отметить, что динамика снижения амплитуды ПЭС сокращения при увеличении ЭСИ не зависела от возраста.

Обсуждение

Общеизвестно, что в процессе онтогенеза происходят структурные и функциональные изменения сосудов и отделов сердца. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что в процессе старения крыс происходит повышение возбудимости сарколеммальной мембраны к 12-му мес. с последующим снижением к 24-му мес. Такой результат может быть отражением динамики возрастных изменений физико-химических свойств сарколеммы и сопряженных с ней ион-транспортных структур. Вероятно, это должно отразиться на возбудимости сарколеммы при патологических состояниях.

Развитие хронической патологии оказывает дополнительные негативные воздействия на соответствующие органы-мишени. Выполнение коронароокклюзии у крыс вызывает развитие обширного трансмурального инфаркта миокарда, запускает процесс постинфарктного ремоделирования сердца и формирование грубых органических поражений папиллярных мышц в зоне поражения [12, 13].

Ранее нами было показано, что у животных в возрасте 12 и 24 мес. постинфарктное ремоделирование сопровождается менее выраженным увеличением массы сердца и отношения массы сердца к массе тела животного в сравнении с 4-месячными животными. По степени выраженности изменения гравиметрических показателей постинфарктной гипертрофии миокарда исследованные возрастные группы располагались в обратной зависимости от возраста [6]. Считается, что сердечная мышца не обладает репаративной регенерацией [18], и утрата части рабочего миокарда возмещается за счет гипер-

трофии оставшихся жизнеспособных клеток. Известно, что фактором, запускающим развитие гипертрофии сердечной мышцы, в том числе в условиях формирования ПИКС, является увеличение функциональной нагрузки на жизнеспособный миокард [19]. Вполне вероятно, что возрастные особенности реализации постинфарктной гипертрофии в различные периоды онтогенеза у крыс отразятся на работе систем, ответственных за реализацию процесса электромеханического сопряжения. Значительную роль в обеспечении контрактильной функции кардиомиоцитов, играют внутриклеточные осцилляции Ca^{2+} . Их проявление определяется согласованной работой Ca^{2+} -транспортных систем сарколеммы и СПР кардиомиоцитов. Показано, что нарушение их функции является фактором, определяющим развитие электрического ремоделирования миокарда, а также вносит вклад в формирование систолической и/или диастолической дисфункции миокарда у лиц, страдающих сердечной недостаточностью ишемического генеза [20].

Результаты проведения ЭС теста в группе 4-месячных животных с ПИКС свидетельствуют о снижении возбудимости сарколеммы кардиомиоцитов, поскольку сократительный ответ изолированной полоски папиллярных мышц был получен при более длительных ЭСИ. На основании результатов, полученных при проведении ЭС теста в группе 12-месячных животных с ПИКС, можно предположить, что сарколемма кардиомиоцитов у животных этого возраста оказалась значительно более функционально устойчива к процессам ремоделирования. Увеличение времени ЭСИ, необходимого для проявления сократительного ответа, позволяет судить о снижении возбудимости сарколеммы кардиомиоцитов, что может быть результатом изменения их фосфолипидного состава [21, 22] и микровязкости липидного бислоя [23] в постинфарктном периоде.

Выявленные особенности проявления ЭС инотропного ответа в группе 24-месячных животных с ПИКС сви-

детельствуют об увеличении возбудимости сарколеммы кардиомиоцитов. Это может быть следствием возрастных особенностей изменений сарколеммальной мембраны при постинфарктном ремоделировании сердечной мышцы. Такое объяснение и сам результат ЭС теста хорошо согласуются с нашими ранее опубликованными данными об особенностях изменения структуры и свойств мембраны эритроцитов именно у 24-месячных крыс при экспериментальном ПИКС [24, 25].

Известно, что ионы Ca^{2+} , поступившие дополнительно в миоплазму после внеочередного стимулирующего воздействия, депонируются в СПР [11, 26]. Увеличение пула Ca^{2+} в СПР при адекватном функционировании риадиновых рецепторов обеспечивает выход большего количества этих ионов из СПР при первом ПЭС цикле сокращение-расслабление [16]. Увеличение амплитуды ПЭС-сокращения определяется количеством поступающих из СПР ионов Ca^{2+} .

Отсутствие межвозрастных различий амплитуд ПЭС сокращений в группах ЛО животных, показанное в нашем исследовании, свидетельствует о том, что в процессе онтогенеза СПР кардиомиоцитов крыс сохраняет ведущую роль в механизмах регуляции внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} , оставаясь основным депо этих ионов.

Отмеченное в группе животных 4-месячного возраста с ПИКС наиболее выраженное угнетение относительно ЛО контроля прироста амплитуды ПЭС сокращений при ЭСИ длительностью 0,2 и 0,25 с может быть следствием снижения Ca^{2+} -аккумулирующей способности СПР в результате постинфарктного ремоделирования. Причиной такого нарушения функционирования СПР может являться состояние липидного бислоя мембран и снижение активности Ca^{2+} -АТФазы в результате активации свободнорадикальных процессов при развитии сердечной недостаточности ишемического генеза [27, 28]. ПИКС в меньшей степени повлиял на Ca^{2+} -аккумулирующую способность СПР у 12- и 24-месячных крыс.

Такой результат хорошо согласуется с ранее сделанным предположением о том, что процессы перекисного окисления, активирующиеся в процессе онтогенеза и ассоциированные со старением, не могут приобрести еще большую активность при формировании ПИКС у стареющих животных [28].

В ранее проведенных исследованиях мы показали, что у животных в возрасте 12 и 24 мес. происходит снижение образования первичных продуктов перекисного окисления липидов [24, 28] и карбонильных производных перекисного окисления белков [24]. Низкая интенсивность процессов перекисного окисления липидов и белков у животных старших возрастных групп сохраняется и при постинфарктном ремоделировании [24, 28]. Эти результаты позволяют предположить, что снижение интенсивности перекисной модификации липидов и белков при ПИКС у животных в возрасте 24 мес. способствует сохранению активности Ca^{2+} -АТФазы, что в свою очередь положительно отражается на Ca^{2+} -аккумулирующей способности СПР кардиомиоцитов крыс этой возрастной группы в условиях патологии. Функционально это должно проявиться меньшим снижением ПЭС потенциации относительно группы ЛО животных, что и было продемонстрировано в нашем исследовании.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что изменения возбудимости сарколеммы миокарда имеет выраженную возрастную зависимость, которая проявляется и при постинфарктном ремоделировании миокарда. В то же время возраст не отражается на способности СПР кардиомиоцитов ЛО животных аккумулировать ионы кальция. Однако в условиях постинфарктного ремоделирования СПР крыс именно старших возрастных групп в большей степени сохраняет свою Ca^{2+} -аккумулирующую способность. Полученные результаты расширяют теоретические знания о возрастных изменениях и состоянии адаптационных механизмов стареющей сердечной мышцы при ПИКС.

Литература / References

1. Kane A.E., Bisset E.S., Keller K.M., Ghimire A., Pyle W.G., Howlett S.E. Age, sex and overall health, measured as frailty, modify myofibrillar proteins in hearts from naturally aging mice. *Sci. Rep.* 2020;10:10052. DOI: 10.1038/s41598-020-66903-z.
2. Lakatta E.G., Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation.* 2003;107(2):346–354. DOI: 10.1161/01.cir.0000048893.62841.f7.
3. Билалова Г.А., Ситдилов Ф.Г., Дикопольская Н.Б., Шайхелисламова М.В., Зефирова Т.Л. Адренорецепторы в дофаминергической регуляции сократимости миокарда крыс в онтогенезе. *Биол. эксперим. биол. и мед.* 2016;162(12):738–742. [Bilalova G.A., Sitdikov F.G., Dikopol'skaya N.B., Shaikhelislamova M.V., Zefirova T.L. Adrenoceptors in Dopaminergic Regulation of Rat Myocardial Contractility in Rats During Ontogeny. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;162(12):738–742. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-017-3709-y.
4. Швалев В.Н., Рогоза А.Н., Сергиенко В.Б., Реутов В.П., Аншелес А.А., Тарский Н.А. и др. Морфофункциональная диагностика возрастных нейродистрофических изменений организма, предшествующих внезапной сердечной смерти. *Морфологические ведомости.* 2016;24(4):8–21. [Shvalev V.N., Sergienko V.B., Ansheles A.A., Rogozha A.N., Tarsky N.A., Reutov V.P. et al. The morpho-functional diagnostics of age-related neurodystrophic changing in the organism, which preceded sudden cardiac death. *Morphological newsletter* 2016;24(4):8–21. (In Russ.). DOI: 10.20340/mv-mn.2016.24(4):8-21.
5. Conte M.R. Gender Differences in the Neurohumoral Control of the Cardiovascular System. *Ital. Heart J.* 2003;4(6):367–370.
6. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Островик М.О. Возрастные изменения адренореактивности при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе. *Успехи геронтологии.* 2020;33(4):729–734. [Rebrova T.Yu., Afanasiev S.A., Ostrovik M.O. Age-dependent changes in adrenoactivity in experimental postinfarction atherosclerosis. *Adv. Geront.* 2020;33(4):729–734. (In Russ.). DOI: 10.34922/AE.2020.33.4.015.
7. Путятина А.Н., Ким Л.Б. Внеклеточный матрикс сердца и постинфарктный репаративный фиброз (часть 1). *Вестник САФУ. Серия: Медико-биологические науки.* 2016;4:54–66. [Putyatina A.N., Kim L.B. Extracellular matrix of the heart and post-infarction reparative fibrosis (part 1). *Vestnik SAFU. Series: Medico-biological sciences.* 2016;4:54–66. (In Russ.). DOI: 10.17238/issn2308-3174.2016.4.54.
8. Izu L.T., Kohl P., Boyden P.A., Miura M., Banyasz T., Chiamvimonvat N. et al. Mechano-electric and mechano-chemo-transduction in cardiomyocytes. *J. Physiol.* 2020;598(7):1285–1305. DOI: 10.1113/JP276494.
9. Yue P., Long C.S., Austin R., Chang K.C., Simpson P.C., Massie B.M. Post-infarction heart failure in the rat is associated with distinct alterations in cardiac myocyte molecular phenotype. *Mol. Cell Cardiol.* 1998;30(8):1615–1630. DOI: 10.1006/jmcc.1998.0727.
10. Cheng Y., Li W., Mc Elfresh T.A., Chen X., Berthiaume J.M., Castel L. et al. Changes in myofibrillar proteins, but not Ca^{2+} -regulation, are associated with a high-fat diet-induced improvement in contractile function in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;301(4):H1438–H1446. DOI: 10.1152/ajpheart.00440.2011.
11. Yano M., Ikeda Y., Matsuzaki M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure. *J. Clin. Invest.* 2005;115(3):556–564. DOI: 10.1172/JCI24159.
12. Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Фалалева Л.П., Шахов В.П.

- Инотропная реакция миокарда крыс с постинфарктным кардиосклерозом на экстрасистолические воздействия. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2005;139(6):613–616. [Kondrat'eva D.S., Afanas'ev S.A., Falaleeva L.P., Shakhov V.P. Inotropic response of the myocardium in rats with postinfarction cardiosclerosis exposed to extrasystolic treatment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2005;139(6):647–650. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-005-0367-2.
13. Sadredini M., Danielsen T.K., Aronsen J.M., Manotheepan R., Hougen K., Sjaastad I. et al. Beta-adrenoceptor stimulation reveals Ca²⁺ waves and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in left ventricular cardiomyocytes from post-infarction rats with and without heart failure. *PLoS one*. 2016;11(4):e0153887. DOI: 10.1371/journal.pone.0153887.
14. Vassallo D.V., Lima E.Q., Campagnaro P., Faria A.N., Mill J.G. Mechanisms underlying the genesis of post-extrasystolic potentiation in rat cardiac muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1995;28(3):377–383.
15. Nakipova O.V., Averin A.S., Evdokimovskii E.V., Pimenov O.Y., Kosarski L., Ignat'ev D. et al. Store-operated Ca²⁺ entry supports contractile function in hearts of hibernators. *PLoS One*. 2017;22;12(5):e0177469. DOI: 10.1371/journal.pone.0177469.
16. Ji Y.C., Gray R.A., Fenton F.H. Implementation of contraction to electrophysiological ventricular myocyte models, and their quantitative characterization via post-extrasystolic potentiation. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135699. DOI: 10.1371/journal.pone.0135699.
17. Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Путрова О.Д., Перчаткин В.А., Репин А.Н. Возрастные особенности внутриклеточного гомеостаза кальция в кардиомиоцитах крыс при постинфарктном ремоделировании сердца. *Успехи геронтол.* 2010;23(1):59–63. [Afanasiev S.A., Kondratieva D.S., Putrova O.D., Perchatkin V.A., Repin A.N. Age-related features of an intracellular calcium homeostasis in rat cardiomyocytes at postinfarction heart remodeling. *Adv. Gerontol.* 2010;23(1):59–63. (In Russ.).]
18. Рубина К.А., Мелихова В.С., Парфенова Е.В. Резидентные клетки – предшественники в сердце и регенерация миокарда. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2007;2(1):29–35. [Rubina K.A., Melikhova V.S., Parfenova E.V. Resident cardiomyocyte precursors and myocardium regeneration. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2007;2(1):29–35. (In Russ.).]
19. Gan X.T., Ettinger G., Huang C.X., Burton J.P., Haist J.V., Rajapurohitam V. et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ. Heart Fail.* 2014;7(3):491–499. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000978.
20. Mora M.T., Ferrero J.M., Gomez J.F., Sobie E.A., Trenor B. Ca²⁺ cycling impairment in heart failure is exacerbated by fibrosis: insights gained from mechanistic simulations. *Front. Physiol.* 2018;9:1194. DOI: 10.3389/fphys.2018.01194.
21. Moriyama H., Endo J., Ikura H., Kitakata H., Momoi M., Shinya Y. et al. Qualitative and quantitative effects of fatty acids involved in heart diseases. *Metabolites*. 2022;12(3):210. DOI: 10.3390/metabo12030210.
22. Афанасьев С.А., Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С. Особенности фосфолипидного состава мембран эритроцитов в условиях постинфарктного кардиосклероза. *Биомедицинская химия.* 2007;53(5):541–546. [Afanasiev S.A., Rebrova T.Y., Kondratieva D.S. Phospholipid composition of erythrocyte membrane under conditions of postmyocardial infarction cardiosclerosis. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2008;2(2):166–168. (In Russ.). DOI: 10.1134/S1990750808020066.
23. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Путрова О.Д., Попов С.В. Возрастзависимые особенности микровязкости мембран эритроцитов при экспериментальном кардиосклерозе. *Успехи геронтологии.* 2012;25(4):644–647. [Rebrova T.Yu., Afanasiev S.A., Putrova O.D., Popov S.V. Age-related features of microviscosity of erythrocyte membranes in experimental cardiosclerosis. *Adv. Gerontol.* 2013; 3(3):211–214. (In Russ.). DOI: 10.1134/S2079057013030119.
24. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А. Возрастные особенности активности свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов и плазме крови при постинфарктном кардиосклерозе у крыс. *Казанский медицинский журнал.* 2018;99(4):629–634. [Rebrova T.Yu., Afanas'ev S.A. Age-related features of activity of free radical oxidation in erythrocyte membranes and blood plasma in post-infarction cardiosclerosis in rats. *Kazan Medical Jour.* 2018;99(4):629–634. (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ2018-629.
25. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Попов С.В. Возрастные особенности окислительной модификации компонентов эритроцитарных мембран и активность Na⁺/K⁺-АТФазы при формировании кардиосклероза у крыс. *Дальневосточный медицинский журнал.* 2017;3:63–66. [Rebrova T.Yu., Afanas'ev S.A., Popov S.V. Age-related of oxidative modification of erythrocyte membrane components and Na⁺/K⁺-ATPase activity in formation of cardioclerosis in rats. *Far. Eastern Medical Journal.* 2017;3:63–66. (In Russ.).]
26. Marengo F.D., Márquez M.T., Bonazzola P., Ponce-Hornos J.E. The heart extrasystole: an energetic approach. *Am. J. Physiol.* 1999;276(1):H309–H316. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.276.1.H309.
27. Köhler A.C., Sag C.M., Maier L.S. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014;73:92–102. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.001.
28. Rebrova T.Yu., Afanasiev S.A. State of the antioxidant system and the severity of lipid-peroxidation processes in the myocardium and blood plasma of rats of different ages with postinfarction cardiosclerosis. *Advances in Gerontology.* 2021;11(2):152–157. DOI: 10.1134/S2079057021020132.

Информация о вкладе авторов

Реброва Т.Ю. – выполнение электрофизиологических тестов на изолированных полосках папиллярных мышц из миокарда экспериментальных животных, написание первоначального варианта статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

Афанасьев С.А. – существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

Кондратьева Д.С. – выполнение экспериментов по моделированию сердечной недостаточности у экспериментальных животных, корректировка первоначального варианта статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

Островик М.О. – обработка кривых сокращения-расслабления, полученных при проведении экстрасистолического теста, статистическая обработка данных, оформление таблиц, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

Попов С.В. – существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

Information on author contributions

Rebrova T.Yu. – completing electrophysiological tests on isolated strips of papillary muscles from the myocardium of experimental animals, writing the initial version of the article, approving the final version for publication, full responsibility for the content.

Afanasiev S.A. – significant contribution to the concept and design of the study, correction of the article, approval of the final version for publication, full responsibility for the content.

Kondratieva D.S. – performing experiments on modeling heart failure in experimental animals, correcting the original version of the article, approving the final version for publication, full responsibility for the content.

Ostrovik M.O. – processing of contraction-relaxation curves obtained during the extrasystolic test, statistical processing of data, design of tables, approval of the final version for publication, full responsibility for the content.

Popov S.V. – significant contribution to the concept and design of the study, correction of the article, approval of the final version for publication, full responsibility for the content.

Сведения об авторах

Реброва Татьяна Юрьевна, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0003-3667-9599.

E-mail: rebrova@cardio-tomsk.ru.

Кондратьева Дина Степановна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-4004-2497.

E-mail: dina@cardio-tomsk.ru.

Афанасьев Сергей Александрович, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-6066-3998.

E-mail: tursky@cardio-tomsk.ru.

Островик Маргарита Олеговна, младший научный сотрудник, лаборатория регистров сердечно-сосудистых заболеваний, высокотехнологичных вмешательств и телемедицины, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-7118-8897.

E-mail: ostrovik@cardio-tomsk.ru.

Попов Сергей Валентинович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор Научно-исследовательского института кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-9050-4493.

E-mail: svp@cardio-tomsk.ru.

 **Реброва Татьяна Юрьевна**, e-mail: rebrova@cardio-tomsk.ru.

Information about the authors

Tatiana Yu. Rebrova, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Molecular and Cellular Pathology and Genetic Testing, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0003-3667-9599.

E-mail: rebrova@cardio-tomsk.ru.

Dina S. Kondratieva, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Molecular and Cellular Pathology and Genetic Testing, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-4004-2497.

E-mail: dina@cardio-tomsk.ru.

Sergey A. Afanasiev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Molecular and Cellular Pathology and Genetic Testing, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-6066-3998.

E-mail: tursky@cardio-tomsk.ru.

Margarita O. Ostrovik, Junior Research Scientists, Laboratory of Registries of Cardiovascular Diseases, High-Tech Interventions and Telemedicine, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-7118-8897.

E-mail: ostrovik@cardio-tomsk.ru.

Sergey V. Popov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-0567-4616.

E-mail: svp@cardio-tomsk.ru.

 **Tatiana Yu. Rebrova**, e-mail: rebrova@cardio-tomsk.ru.

Received January 27, 2023

Поступила 27.01.2023



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-118-125>
УДК 616.24-085.849.5-06:616.24-002-073.756.8]-092.9

Изучение развития лучевого пневмонита в легких у крыс при ротационном и статическом облучении

О.А. Пашковская^{1, 2}, Н.А. Филатова^{1, 2}, А.А. Докучаева¹, В.В. Шигаев¹,
С.Э. Красильников¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации,

630055, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

630090, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Аннотация

Использование в клинической практике результатов исследований по лучевой терапии (ЛТ) на животных в настоящее время незначительно. Исследование лучевых осложнений после облучения легких у крыс с помощью облучателя с визуальным контролем SmART+ (Precision, Северный Бранфорд, Коннектикут, США) является пилотным для разработки модели радиационно-индуцированной легочной токсичности на животных.

Цель работы: определение дозы и объема облучения мишени в легких у крыс, при которых характерно развитие лучевого пневмонита.

Материал и методы. В исследовании были определены 4 группы крыс линий Wag и Wistar, отличающиеся возрастом (10–16,5 мес.) и весом (350–850 г). Облучение мишени в легком проводилось с предварительным дозиметрическим планированием в статическом или ротационном режимах, различными дозами (от 10 до 30 Гр), объемами мишени в легком (0,045–1,24 см³) и локализацией (левое или правое легкое, верх или низ легкого). Дозиметрическое планирование обеспечивает оптимальное лучевое воздействие на мишень и контроль дозовых нагрузок на органы риска. Развитие лучевых повреждений наблюдалось на КТ сканированиях в течение 16 нед.

Результаты. Для получения плотности легких крыс (в единицах Хаунсфилда) было проведено КТ сканирование здоровых животных, выполнена обработка снимков, определены среднее значение и стандартное отклонение плотности. Значения плотности легких крыс (в единицах Хаунсфилда) составили – 519,6 ± 46,2 (контрольные значения). Выполнено сравнение экспериментальных данных для облученных животных и контрольных значений. В результате анализа установлена зависимость объема мишени, подведенной дозы и выживаемости животных после облучения. Показано, что параметр «среднее значение плотности легкого (в единицах Хаунсфилда)» может использоваться для количественного анализа изменений в легком после облучения.

Выводы. Определены доза и объем облучения мишени в легких у крыс, при которых характерно развитие лучевого пневмонита. При дозе облучения 16 Гр и объеме облученного легкого не менее 0,5 см³ (8%) характерно появление участка снижения пневматизации в зоне облучения.

Ключевые слова:	лучевой пневмонит, облучение легких крыс, КТ сканирование, плотность легкого в единицах Хаунсфильда.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Соответствие принципам этики:	все манипуляции с животным проводились в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принята в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтверждена 15.06.2006 г.) и по правилам ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».
Для цитирования:	Пашковская О.А., Филатова Н.А., Докучаева А.А., Шигаев В.В., Красильников С.Э. Изучение развития лучевого пневмонита в легких у крыс при ротационном и статическом облучении. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):118–125. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-118-125 .

Пашковская Оксана Александровна, e-mail: o_pashkovskaja@meshalkin.ru.

Study of radiation-induced pneumonitis after arc and static irradiation in lungs of rats

Oksana A. Pashkovskaya^{1,2}, Natalya A. Filatova^{1,2}, Anna A. Dokuchaeva¹,
Vadim V. Shigaev¹, Sergey E. Krasilnikov¹

¹ E.Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of Russian Federation,
15, Rechkunovskaya str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation

² Novosibirsk State University
2, Pirogova str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

Abstract

The clinical application of the results of the experimental radiotherapy on animals is currently not widely used. The research of radiation injuries after irradiation target in rat lungs using the image-guided platform SmART+ (Precision, North Branford, Conn., USA) is a pilot study for the establishment of an animal model of radiation-induced pulmonary toxicity.

Aim: To define the typical doses and target volumes in rat lung to observe radiation pneumonitis.

Material and methods. Four groups of Wistar and Wag rats, distinguishing by age (10–16,5 months) and weight (350–850 g.), were studied. Dosimetric treatment plans were calculated prior to irradiation, using arc or static methods, doses (10–30 Gy), target lung volumes (0,045–1,24 cm³), localization (right or left, top or bottom). Dosimetric planning provides optimal radiation exposure to the target and controls organ at risk doses. Computer tomography (CT) scans were performed for 16 weeks to observe radiation pneumonitis

Results. To obtain the rat lung density in Hounsfield units (HU), healthy animals were scanned, CT images were processed, and the mean and standard deviation were calculated. Lung density values of rats (control values) are 519.6 ± 46.2 (HU). Comparison of experimental data on irradiated animals and control values was carried out. As a result, the relationship of the target volume, the delivered dose and the survival rate of animals after irradiation was established. It was shown that the “mean value of lung density” could be used for quantitative analysis of lung injuries after irradiation.

Conclusion. Typical doses and target volumes in rat lungs to observe radiation pneumonitis were obtained. Decreasing aeration of lung tissue was derived at delivered dose 16 Gy and irradiated target volume in lung at least 0.5 cm³ (8%).

Keywords:	radiation pneumonitis, rat lung irradiation, CT scan, lung density in Hounsfield units
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.
Adherence to ethical standards:	all manipulations with the animal were carried out in accordance with the ethical principles established by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (adopted in Strasbourg on March 18, 1986 and confirmed on June 15, 2006) and according to the rules of GOST 33216–2014 “Guide for the care of laboratory animals. Rules for the care of laboratory rodents and rabbits”.
For citation:	Pashkovskaya O.A., Filatova N.A., Dokuchaeva A.A., Shigaev V.V., Krasilnikov S.E. Study of radiation-induced pneumonitis after arc and static irradiation in lungs of rats. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):118–125. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-118-125 .

Введение

Лечение рака легкого (РЛ) является сочетанием нескольких методов лечения (хирургия, лучевая терапия (ЛТ), системная терапия – химиотерапия, иммунотерапия и таргетные препараты). ЛТ является единственным методом лечения при раке легкого, для которого есть показания на всех стадиях заболевания и при любых общих состояниях пациента. Моделирование показало, что 77% пациентов с РЛ имеют научно обоснованные показания к ЛТ [1]. Оптимальное использование ЛТ может привести к 5-летнему росту локального контроля на 8,3% и выживаемости на 4% [2]. 5-летняя выживаемость составляет 23% [3].

Основными исследуемыми задачами в ЛТ является определение оптимальных разовой и суммарной доз,

подводимых к опухоли, схемы фракционирования и общего времени лечения [4, 5]. Исторически дозы в ЛТ выбирались эмпирически, основываясь на клиническом опыте при лечении пациентов. Основным ограничивающим эскалацию дозы фактором является превышение толерантностей критических органов в рамках существующих рекомендаций QUANTEC (Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic) [6], которое приводит к развитию токсических эффектов, таких как лучевой пневмонит и фиброз легочной ткани.

Последние три десятилетия развитие технологий ЛТ позволило улучшить сохранение критических нормальных тканей и увеличить подводимую к опухоли дозу [7–10]. Повышение дозы в областях с высокой молекулярной активностью или пролиферации приводит

к увеличению выживаемости и улучшению локального контроля [11]. Однако также имеются клинические исследования, изучавшие эту гипотезу [12, 13], которые не устанавливают истинную связь увеличения дозы и повышения выживаемости. Это объясняется в первую очередь множеством ограничений, связанных с сопутствующими заболеваниями пациентов. В настоящее время нет оснований полагать, что применение инновационных технологий и эскалация дозы в исследованиях на пациентах дают доказательные клинические результаты значительного увеличения выживаемости [14]. Проведение доклинических исследований может помочь расширить данные для определения эффективности повышения дозы.

В настоящий момент использование в клинической практике результатов исследований на животных незначительно. Это в первую очередь связано с отсутствием широкого использования соответствующей приборно-экспериментальной базы, а также сложностью трансляции результатов доклинических исследований в клиническую практику. Экспериментальные данные предоставили лишь поверхностные знания или подтвердили биологические основания клинических наблюдений. Например, ранние результаты ЛТ на животных доказали, что доза за фракцию имеет принципиальное значение в снижении поздних лучевых реакций. В исследовании по облучению легких у крыс было показано, что риск развития симптоматического лучевого пневмонита возрастает при облучении в облучение части сердца [15]. Облучение основания легкого у мышей с большей вероятностью вызывает лучевую пневмонит, чем облучение верхушки или срединной части легкого. Поскольку гистологическое повреждение легкого не зависит от локализации облучения, были сделаны выводы о функциональной значимости различных отделов легкого [16, 17].

В доклинических исследованиях на животных, в отличие от клинической практики, редко применяются конформные методики ЛТ, в частности IMRT и VMAT. Также использование данных ранних исследований ЛТ на животных сильно ограничено ввиду того, что распределение изодоз сильно отличается от используемых в современной практике. В последнее время получило широкое применение использование химиотерапевтических препаратов для радиомодификации во время ЛТ. Для получения достоверных данных в эксперименте должно использоваться оборудование, функционально схожее с клиническим, а также методики облучения должны полностью имитировать клинические. Исследование лучевых осложнений после облучения легких у крыс с помощью облучателя с визуальным контролем может позволить отработать методы ЛТ (различные дозы, объемы облучения, методики подведения, вовлеченность здоровых структур и дозовая нагрузка критических органов) при РЛ. Применение химио- и лечебных препаратов в лабораторных условиях на живых организмах, в частности крысах, также поможет исследовать воздействие новых препаратов совместно с ЛТ.

Цель работы: определение дозы и объема облучения мишени в легких у крыс, при которых характерно развитие лучевого пневмонита.

Предполагается использовать данное исследование в качестве базового для разработки модели радиационно-индуцированной легочной токсичности на животных.

Материал и методы

Экспериментальная работа состояла из следующих этапов:

1. Однократное облучение мишени в легких крыс в статическом или ротационном режимах, различными дозами (от 10 до 30 Гр), объемами (0,045–1,24 см³) и локализацией (левое или правое легкое, верх или низ легкого) под визуальным контролем с предварительным дозиметрическим планированием.
2. Проведение еженедельных КТ исследований для наблюдения развития лучевых повреждений (в течение 16 нед.).
3. Обработка снимков.
4. Анализ данных для определения дозы и объема облучаемой мишени, при которых развивается лучевой пневмонит.

Оборудование

Для облучения крыс и наблюдения в работе использовался облучатель с визуальным контролем SmART+ (Precision, Северный Бранфорд, Коннектикут, США), рисунок 1.



Рис. 1. Облучатель с визуальным контролем SmART +
Fig. 1. Image-guided irradiation platform SmART +

Аппарат, оснащенный рентгеновской трубкой, системой коллимации (фильтр для визуализации – 2 mm Al, фильтр для облучения – 0,3 mm Cu; фиксированный коллиматор, определяющий размер поля облучения), панелью визуализации (плоскопанельный детектор) и моторизованным трехмерно движущимся столиком, позволяет проводить облучение в статическом и ротационном режимах, а также выполнять диагностическое и топометрическое КТ сканирование. Облучение проводится при энергии 225 кВ. Мощность дозы для 10 мм коллиматора с круглым отверстием составляет 4,70 Гр/мин.

Группы животных

Для исследования были определены 4 группы крыс. Группы между собой отличались возрастом (10–16,5 мес.) и линией (Wag, Wistar). Группа G1: 6 животных ли-

нии Wistar, возраст 16,5 мес., вес 650–850 г. Группа G2: 3 животных линии Wag, возраст 10 мес., вес 300–400 г. Группа G3: 3 животных линии Wag, возраст 11 мес., вес 350 г. Группа G4: 3 животных линии Wag, возраст 13 мес., вес 350–400 г. Все экспериментальные процедуры над животными проводились после оказания анестезиологического пособия. Применялся Золетил (Virbac, Франция) в дозировке 30 мг/кг, внутримышечное введение в заднебедренную группу мышц, атропин сульфат (Дальхимфарм, Россия) в дозировке 0,01 мг/кг массы тела животного инъецировался подкожно в холку.

Облучение

Подготовка к облучению включала КТ сканирование зоны облучения (весь объем легких, а также краниальный и каудальный отступы 5–10 мм), оконтуривание и дозиметрическое планирование. Оконтуривание выполнялось с помощью программного обеспечения SmART-ATP 2.0. В качестве оконтуренных структур определялись сердце, правое легкое, левое легкое, спинной мозг, мишень. На этапе дозиметрического планирования изоцентр, объем облучения, доза, методика облучения (статическое или ротационное) выбирались произвольно с учетом минимально возможных нагрузок на сердце и спинной мозг животного. Расчет доз производился программой SmART-ATP, использующей для расчета алгоритм МонтеКарло. Далее выполнялась выдача дозы по рассчитанному плану. Параметры рентгеновской трубки при облучении: составляли: напряжение 225 кВ, ток 30 мА. Животные во время топометрической подготовки находились на столике ускорителя в неподвижном состоянии. Контроль за животными осуществлялся с помощью камеры, расположенной внутри облучателя.

Наблюдение

Наблюдение за животными длилось 16 нед. и включало еженедельное измерение веса, частоты дыхательных движений, оценку общего состояния, проведение КТ сканирования легких. В период с 4-й по 6-ю нед. после облучения проводилось еженедельное сканирование. В остальное время сканирование осуществлялось раз в две недели. КТ-изображения в формате DICOM были получены с помощью системы SmART + при использовании 2 мм алюминиевого фильтра. Параметры рентгеновской трубки при сканировании составляли: напряжение 40 кВ, ток 5 мА. В случае смерти животного проводилось вскрытие и определение причины смерти.

Обработка снимков

1. Обработка снимков осуществлялась с помощью медицинского диагностического программного обеспечения AW VolumeShare 7 (GE Healthcare, Франция) и включало следующие этапы:

2. Подбор порога значений чисел HU с целью максимального захвата легких животного и исключения других тканей и органов (от –1023 HU до –322 ÷ –190 HU). В случаях, когда не удавалось автоматически удалить структуры (трахея, кишечник), эти структуры удалялись вручную.

3. Определение 3D области интереса (ROI). Было выделено 3 объема ROI: ROI1 – правое легкое, ROI2 – левое легкое, ROI3 – оба легких. Разделение на ROI1 и ROI2 проводилось условно по позвоночнику, ввиду особенностей строения легких – добавочная доля прилежит к каудальной доле правого легкого и левому легкому.

Анализ и сохранение данных.

Алгоритм анализа данных

Для определения доз и объема облучения, при которых характерно развитие лучевого пневмонита, был разработан следующий алгоритм:

1. Определение контрольных значений плотности легких (в единицах HU) здоровых животных.

2. Определение зависимостей параметров облучения (Dmean lung, D5 lung, Dmean heart, D5 heart, Dmean spinal cord, D5 spinal cord, % (), V target vs. Dose) и выживаемости животных после облучения.

3. Построение графиков значений средней плотности легких (в единицах HU) за весь период наблюдения.

4. Сравнение данных для облученных и контрольных животных.

5. Определение характерных значений дозы и объема облучения.

Результаты

В результате дозиметрического планирования были получены гистограммы дозаобъем (DVH) и определены следующие параметры: V – объем (см³) оконтуренной структуры; D_{mean} – средняя доза (Гр), получаемая структурой за облучение (Гр); D₉₅ – доза (Гр), которую получает 95% объема структуры; D₅ – доза (Гр), которую получают 5% объема структуры.

Данные, выбранные на этапе планирования (методика облучения, размер коллиматора, доза, локализация), а также полученные с помощью гистограммы DVH, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры облучения животных и результаты расчетов доз, получаемых в результате дозиметрического планирования

Table 1. Irradiation parameters of animals and results of dose calculation by dosimetric planning

№	Метод подведения дозы Dosing method	Доза, гр Dose, gr	R/L	V (target) cm ³	V (lung) cm ³	% облуч. легкого % of lung irradiated	D5 (lung)	D5 (heart)	D5 (sp. cord)	Dmean (lung)	Dmean (heart)	Dmean (sp. cord)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G1 rat3	VMAT	16	R	0,53	6,3	8	15,6	1,4	1	3,8	0,4	0,2
G1 rat4	VMAT	20	L	0,56	3,1	18	20,1	6,8	3,1	4,8	2	0,5
G1 rat5	VMAT	30	L	0,065	3,5	1,8	12,8	3	1,6	1,7	0,5	0,2
G1 rat6	VMAT	30	L	0,063	5,5	1,1	7,5	4,8	2,5	1,2	0,7	0,3
G2 rat1	статика static	12	L	1,24	4,23	29,3	12,1	0,2	0,1	3,5	0,1	0,1

Окончание табл. 1
End of table 1

№	Метод подведения дозы Dosing method	Доза, гр Dose, gr	R/L	V (target) cm ³	V (lung) cm ³	% облуч. легкого % of lung irradiated	D5 (lung)	D5 (heart)	D5 (sp. cord)	Dmean (lung)	Dmean (heart)	Dmean (sp. cord)
G2 rat2	статика static	15	L	0,22	5,34	4,1	2,3	0,1	0,1	0,7	0,1	0
G2 rat3	статика static	15	L	0,2	2,72	7,4	13,4	0,1	0	1,2	0	0
G3 rat1	VMAT	16	R	0,045	3,78	1,2	5	11	1,3	0,7	0,2	0,2
G3 rat2	VMAT	20	L	0,047	3,9	1,2	9,1	5,5	3,9	1,3	1,2	0,5
G3 rat3	статика static	12	L	0,33	3,35	9,8	11,7	0,2	0,1	1,3	0,1	0
G4 rat1	VMAT	12	R	0,27	6,37	4,2	11	6,1	3,3	1,6	1,5	0,9
G4 rat2	VMAT	20	L	0,046	4,67	0,98	6,1	0,6	0,7	1	0,1	0,1
G4 rat3	статика static	20	R	0,55	5,1	10,8	20,1	0,2	0,2	2,9	0,1	0,1

Note: VMAT – Volumetric modulated are therapy.

Анализ зависимостей параметров облучения

Данные таблицы 1 были использованы для анализа параметров облучения и выживших животных. Выявлена статистически значимая корреляция объема мишени и подведенной дозы (Vtarget vs. Dose), коэффициент корреляции Пирсона составил –0,54 (рис. 2).

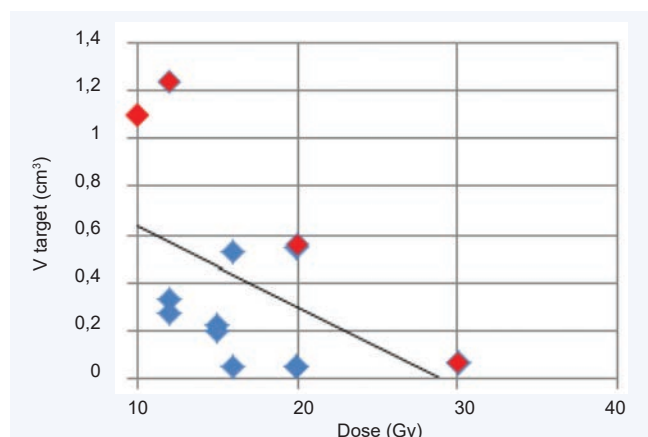


Рис. 2. Зависимость параметров облучения V target vs. Dose. Умершие животные показаны красным маркером

Fig. 2. Irradiation parameter V target vs. Dose. Dead animals are shown with a red marker

Анализ графика показал, что точки, соответствующие умершим животным (красный маркер), лежат выше аппроксимационной линии.

Средние значения плотности легких облученных животных

Используя алгоритм анализа данных, описанный выше, была выполнена обработка 90 серий снимков КТ сканирования животных (период наблюдения – 16 нед.). Были получены средние значения плотности легких (в единицах HU). На основании данных средних значений плотности были построены графики изменений среднего значения плотности (HU) легких в зависимости от недели наблюдения. Обработка снимков проводилась двумя группами исследователей независимо. Сравнение данных двух групп не выявило статистически значимых различий ($p = 0,826$). Сравнение средних значений HU

выполнялось с помощью *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок.

На примере rat2.2 представлены изменения средних значений плотности в единицах Хаунсфильда (HU) легких (правое-R, левое-L, оба-both) в течение всего периода наблюдения (16 нед.), таблица 2. Построены графики (рис. 3), отражающие зависимости средних значений плотностей HU (R), HU (L), HU (both) vs. Week (неделя наблюдения).

Таблица 2. Средние значения плотности легких (R, L, both) в числах Хаунсфильда (HU) для животного rat2.2

Table 2. The mean lung density in Hounsfield units (HU) (R, L, both) for animal rat2.2

Неделя Week	HU (R)	HU (L)	HU (boh)
0	-574,5	-575,9	-575
2	564	-575,7	-569
4	-573,7	-562,9	-569,4
5	-555	-553,2	-554,2
6	-530,2	-531,6	-530,5
8	-584	-60764	-593,5
10	-598,1	-602,2	-599,8
12	-633,8	-634,2	-634,2
14	-614,1	-627,3	-620
16	-596	-605,4	-599,5

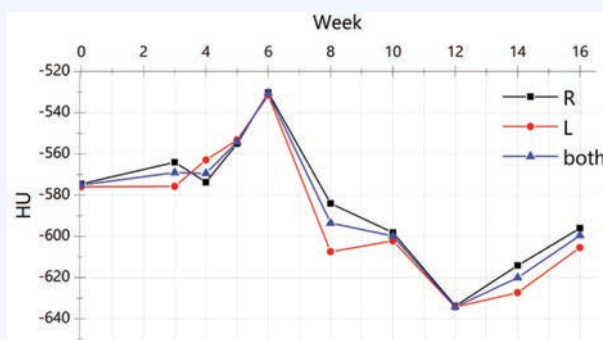


Рис. 3. Средние значения плотности легких в числах Хаунсфильда в зависимости от недели наблюдения для животного rat2.2: R – правое легкое, L – левое легкое, both – оба легких

Fig. 3. The mean lung density in Hounsfield units depending on follow-up week for animal rat2.2: R – right lung, L – left lung, both – both lungs

Определение контрольных значений

Определение среднего значения HU легких здоровых крыс (контрольные значения) проводилось на основании данных «0 недели» (топометрические снимки до облучения) и КТ снимков здоровых животных вивария (того же возраста и веса, что и участвующие в эксперименте животные). Всего было использовано 16 серий снимков здоровых животных. Обработка снимков осуществлялась по тому же алгоритму, что и для облученных животных.

На основании средних значений HU посчитан усредненный показатель «средних значений HU» – (HU: -519,6) и определено стандартное отклонение – ($\pm 46,2$). Таким образом, был установлен «коридор» значений «среднего значения плотности легкого (в единицах HU)» для крыс.

Анализ средних значений плотности легких (в единицах HU) у облученных животных

Для достижения поставленной в работе цели, а именно определения дозы и объема облучения, при которых

характерно развитие лучевого пневмонита, то есть появление очагов пневматизации (областей в легких со значениями HU выше, чем у здоровых животных), проведено сравнение данных для облученных животных и контрольных значений. Для этого были построены графики средних значений HU всех облученных животных (черный график) за весь период наблюдения с так называемым «коридором» контрольных значений. Середина «коридора» (зеленая линия) – это усредненное значение для здоровых животных (HU: -519,6), верхняя граница (красная линия) – это усредненное значение для здоровых животных плюс стандартное отклонение (HU: -473,3), нижняя граница (синяя линия) – это усредненное значение для здоровых животных минус стандартное отклонение (HU: -565,8). Характерное увеличение плотности (выход из «коридора») в период со 2-й по 6-ю нед. считался проявлением лучевого пневмонита. Данный эффект наблюдается для двух животных rat1.3 и rat2.3 (рис. 4).

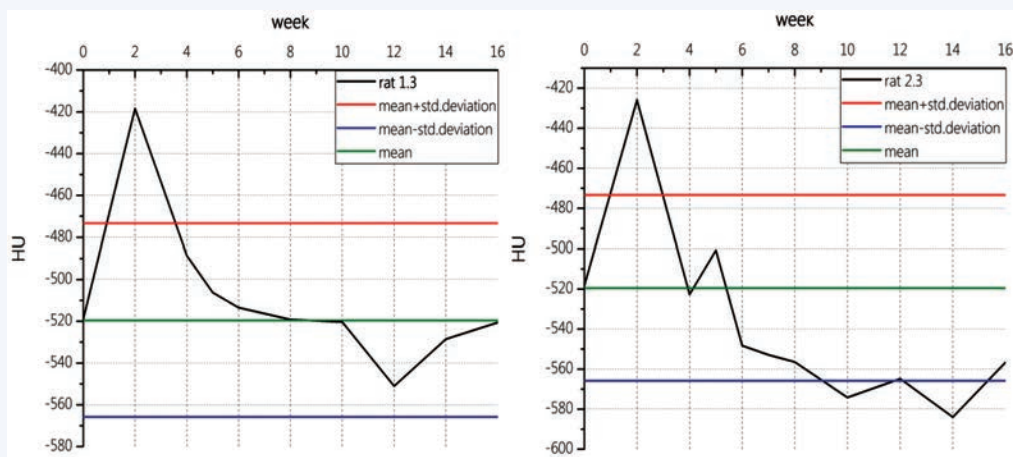


Рис. 4. Графики для животных rat1.3 (слева) и rat2.3 (справа): среднее значение плотности для облученных животных (черная линия), усредненное значение плотности легких здоровых животных (зеленая линия), усредненное значение для здоровых животных плюс стандартное отклонение (красная линия), усредненное значение для здоровых животных минус стандартное отклонение (синяя линия)
Fig. 4. Charts for animals rat1.3 (left) and rat2.3 (right): the mean lung density for irradiated animals (black), the mean lung density for healthy animals (green), the mean lung density for healthy animals plus SD (red), the mean lung density for healthy animals minus SD (blue)
Note: SD - Среднеквадратическое отклонение

Обсуждение

В рамках исследования проводилось облучение мишени в легких у крыс различными дозами и объемами, а также наблюдение развития лучевого пневмонита.

Анализ областей интереса

При построении графиков среднего значения плотности легкого (в единицах HU) в зависимости от недели наблюдения для ROI1, ROI2 и ROI3 различия не существенны. Сравнение проводилось для значений облученного легкого и общего объема двух легких по критерию Манна – Уитни ($p = 0,05$). По этой причине итоговый анализ данных выполнялся только для ROI3. Также, используя в анализе ROI3, мы исключили неопределенность, связанную с неоднозначным разделением на снимках объемов правого и левого легких.

Описание снимков

Для независимой проверки данных эксперимента для всех животных были составлены протоколы описания КТ

снимков врачом-рентгенологом (с опытом клинической работы более 20 лет).

Появление участка снижения пневматизации по описанию КТ снимков наблюдается у rat1.3, rat2.2, rat3.2, rat4.1. Пример лучевого пневмонита для животного rat3.2 с 0-й по 6-ю нед. показан на рисунке 5.

Использование данных исследования

В работе было показано, что параметр «среднее значения плотности легкого (в единицах HU)» может использоваться для количественного анализа изменений в легком после облучения. Согласие экспериментальных данных с описанием снимков врачом-рентгенологом позволяет сделать вывод о возможности использования полученных результатов (характерной дозы и объема облучения, при которых развивается лучевой пневмонит) для планирования нового эксперимента, в котором можно получить средние значения плотности легких HU облученных тканей легкого на большой популяции жи-

вотных, а также далее планировать эксперимент с применением химиопрепаратов и лекарственных средств, предотвращающих появление лучевого пневмонита

или снижающих его проявления. Такое исследование будет важно для доклинических экспериментов новых препаратов.

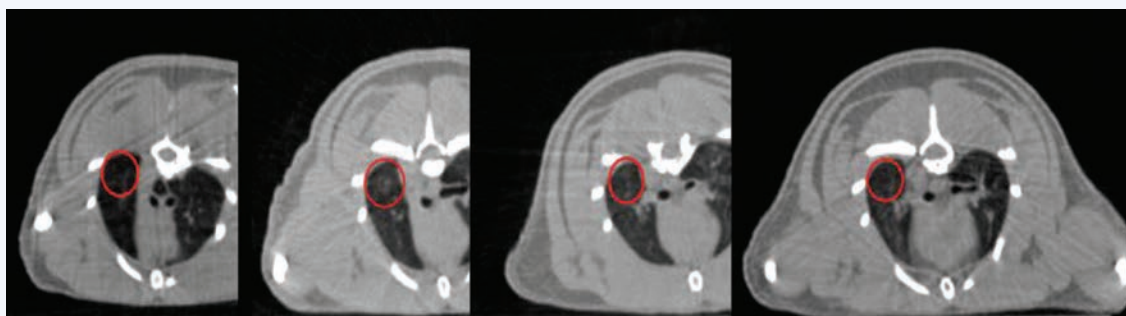


Рис. 5. Этапы развития лучевого пневмонита (0, 2, 4, 6 нед.) для животного rat3.2. Показан участок снижения пневматизации (выделен красным цветом)

Fig. 5. Radiation pneumonitis progression (weeks 0, 2, 4, 6) for animal rat3.2. The region of decreasing aeration is shown (red circle)

Выводы

По результатам анализа параметров облучения и выживших животных установлено, что:

Увеличение средней дозы (D_{mean}) на легкие более 3 Гр приводит к увеличению смертности.

Доза облучения 30 Гр ведет к смертности вне зависимости от D_{mean} и D_5 (на легкие, сердце, спинной мозг).

Объем облученного легкого более 15% приводит к увеличению смертности.

По графикам изменений средних значений плотности легкого (в единицах HU) и описания КТ снимков определены доза и объем облучения мишени в легких у крыс,

при которых характерно развитие лучевого пневмонита. При дозе облучения 16 Гр и объеме облученного легкого не менее 0,5 см³ (8% общего объема легких) типично появление участка снижения пневматизации в зоне облучения.

В результате выполнения работы была разработана методика количественного анализа экспериментальных данных после облучения легких крыс.

Планируется исследование с большим количеством животных, а также разработка метода автоматической обработки КТ снимков для определения среднего значения плотности легких.

Литература / References

- Vinod S. International patterns of radiotherapy practice for non-small cell lung cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2015;25(2):143–150. DOI: 10.1016/j.semradonc.2014.11.001.
- Shafiq J., Hanna T., Vinod S., Delaney G., Barton M. A population-based model of local control and survival benefit of radiotherapy for lung cancer. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*. 2016;28(10):627–638. DOI: 10.1016/j.clon.2016.05.006.
- National Cancer Institute. Surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program. Statistical resources. U.S. population data 1969–2004. URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html> (31.01.2023).
- Kepka L., Socha J. Dose and fractionation schedules in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 2021;10(4):1969–1982. DOI: 10.21037/tlcr-20-253.
- Brada M., Forbes H., Ashley S., Fenwick J. Improving Outcomes in NSCLC: Optimum Dose Fractionation in Radical Radiotherapy Matters. *J. Thorac. Oncol.* 2022;17(4):532–543. DOI: 10.1016/j.jtho.2022.01.006.
- Marks L., Yorke E., Jackson A., Ten Haken R.K., Constine L.S., Eisbruch A. et al. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010;76(3):S10–S19. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.07.1754.
- Christian J., Bedford J., Webb S., Brada M. Comparison of inverse-planned three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007;67(3):735–741. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2006.09.047.
- Panakis N., McNair H., Christian J., Mendes R., Symonds-Taylor J.R., Knowles C. et al. Defining the margins in the radical radiotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC) with active breathing control (ABC) and the effect on physical lung parameters. *Radiation Oncol.* 2008;87(1):65–73. DOI: 10.1016/j.radonc.2007.12.012.
- Bedford J., Nordmark H., McNair H.A., Aitken A.H., Brock J.E., Warrington A.P. et al. Treatment of lung cancer using volumetric modulated arc therapy and image guidance: a case study. *Acta. Oncol.* 2008;47(7):1438–1443. DOI: 10.1080/02841860802282778.
- Partridge M., Ramos M., Sardaro A., Brada M. Dose escalation for non-small cell lung cancer: analysis and modelling of published literature. *Radiation Oncol.* 2011;99(1):6–11. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.02.014.
- Bentzen S., Gregoire V. Molecular imaging-based dose painting: a novel paradigm for radiation therapy prescription. *Semin. Radiat. Oncol.* 2011;21(2):101–110. DOI: 10.1016/j.semradonc.2010.10.001.
- van Elmpt W., De Ruyscher D., van der Salm A., Lakeman A., van der Stoep J., Emans D. et al. The PET-boost randomised phase II dose-escalation trial in non-small cell lung cancer. *Radiation Oncol.* 2012;104(1):67–71. DOI: 10.1016/j.radonc.2012.03.005.
- Piroth M., Pinkawa M., Holy R., Klotz J., Schaar S., Stoffels G. et al. Integrated boost IMRT with FET-PET-adapted local dose escalation in glioblastomas. Results of a prospective phase II study. *Strahlenther. Onkol.* 2012;188(4):334–339. DOI: 10.1007/s00066-011-0060-5.
- Bradley J., Paulus R., Komaki R., Masters G., Blumenschein G., Schild S. et al. Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study. *Lancet. Oncol.* 2015;16(2):187–199. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)7120-7-0.
- van Luijk P., Faber H., Meertens H., Schippers J.M., Langendijk J.A., Brandenburg S. et al. The impact of heart irradiation on dose-volume effects in the rat lung. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007;69(2):552–559. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.05.065.
- Liao Z., Travis E., Tucker S. Damage and morbidity from pneumonitis after irradiation of partial volumes of mouse lung. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995;32(5):1359–1370. DOI: 10.1016/0360-3016(94)00660-D.
- Tucker S., Liao Z., Travis E. Estimation of the spatial distribution of target cells for radiation pneumonitis in mouse lung. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997;38(5):1055–1066. DOI: 10.1016/s0360-3016(97)00131-4.

Информация о вкладе авторов

Пашковская О.А. – идея и концепция.
Пашковская О.А., Филатова Н.А., Докучаева А.А. – проведение экспериментальной работы.
Пашковская О.А., Филатова Н.А., Шигаев В.В. – сбор, обработка и анализ данных.
Пашковская О.А., Филатова Н.А. – написание статьи.
Красильников С.Э. – наставничество и редактирование.

Сведения об авторах

Пашковская Оксана Александровна, медицинский физик, младший научный сотрудник, Институт онкологии и нейрохирургии, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-3443-0821.

E-mail: o_pashkovskaja@meshalkin.ru.

Филатова Наталья Анатольевна, медицинский физик, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-0764-914X.

E-mail: n.filatova@g.nsu.ru.

Докучаева Анна Андреевна, младший научный сотрудник, Институт экспериментальной биологии и медицины, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-3260-6491.

E-mail: a_dokuchaeva@meshalkin.ru.

Шигаев Вадим Витальевич, младший научный сотрудник, Институт онкологии и нейрохирургии, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9684-7190.

E-mail: v_shigaev@meshalkin.ru.

Красильников Сергей Эдуардович, д-р мед. наук, профессор, директор Института онкологии и нейрохирургии, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-0687-0894.

E-mail: krasilnikov_s@meshalkin.ru.

 **Пашковская Оксана Александровна**, e-mail: o_pashkovskaja@meshalkin.ru.

Information on author contributions

Pashkovskaya O.A. – study concept and design development.
Pashkovskaya O.A., Filatova N.A., Dokuchaeva A.A. – experimental work.
Pashkovskaya O.A., Filatova N.A., Shigaev V.V. – data collection, processing and analysis.
Pashkovskaya O.A., Filatova N.A. – the article writing.
Krasilnikov S.E. – article supervision and editing.

Information about the authors

Oxana A. Pashkovskaya, Medical Physicist, Junior Research Scientist, Institute of Oncology and Neurosurgery, E.Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of Russian Federation. ORCID 0000-0002-3443-0821.

E-mail: o_pashkovskaja@meshalkin.ru.

Natalya A. Filatova, Medical Physicist, E.Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of Russian Federation. ORCID 0000-0002-0764-914X.

E-mail: n.filatova@g.nsu.ru.

Anna A. Dokuchaeva, Junior Research Scientist, Institute of Experimental Biology and Medicine, E.Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of Russian Federation. ORCID 0000-0002-3260-6491.

E-mail: a_dokuchaeva@meshalkin.ru.

Vadim V. Shigaev, Junior Research Scientist, Institute of Oncology and Neurosurgery, E.Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of Russian Federation. ORCID 0000-0001-9684-7190.

E-mail: v_shigaev@meshalkin.ru.

Sergey E. Krasilnikov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Institute of Oncology and Neurosurgery, E.Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of Russian Federation. ORCID 0000-0003-0687-0894.

E-mail: krasilnikov_s@meshalkin.ru.

 **Oxana A. Pashkovskaya**, e-mail: o_pashkovskaja@meshalkin.ru.

Received October 31, 2022

Поступила 31.10.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-126-132>
УДК 612.359.2:613.25.038:613.263:613.288]-092.9

Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на морфологию печени у молодых и старых крыс

Л.Р. Мустафина¹, С.В. Логвинов^{1,2}, Л.И. Богданова¹, Б.К. Курбатов²

¹ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Российская Федерация, Томск, ул. Киевская, 111а

Аннотация

Печень является сложным метаболическим органом, который посредством регуляции энергетического обмена обеспечивает поддержание гомеостаза всего организма.

Цель исследования: установить морфологические изменения гепатоцитов и экспрессию фактора роста эндотелия сосудов при высокоуглеводной высокожировой диете (ВУВЖД) в зависимости от возраста.

Материал и методы. Проведено гистологическое исследование печени в четырех группах крыс-самцов линии Вистар: группа 1 – 5-месячные животные, содержащиеся на стандартном рационе; группа 2 – 5-месячные, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 2-месячного возраста); группа 3 – 18-месячные, содержащиеся на стандартном рационе; группа 4 – 18-месячные, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 15-месячного возраста). С помощью морфометрических методов определяли удельные объемы (%) неизмененных и двуядерных гепатоцитов, синусоидных капилляров, воспалительных инфильтратов и очагов фиброза в печени. Иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию VEGF в эндотелиальных клетках и в гепатоцитах. Ферментативным колориметрическим методом в сыворотке крови и в печени определяли концентрацию холестерина и триглицеридов.

Результаты. Морфологическое исследование выявило значительное расширение синусоидных капилляров в группах 2 и 4. Статистически значимое увеличение удельных объемов гепатоцитов с вакуолярными включениями, двуядерных гепатоцитов, фиброзных очагов и мелких воспалительных инфильтратов было установлено в группе 4. Экспрессия VEGF возрастала в гепатоцитах групп 2 и 4. Биохимическое исследование выявило увеличение концентрации триглицеридов в печени крыс группы 4. Таким образом, ВУВЖД, несмотря на выраженные признаки регенерации, усугубляла возрастные изменения в печени старых крыс.

Ключевые слова:	возрастные изменения печени, высокоуглеводная высокожировая диета, эндотелиальный сосудистый фактор, неалкогольная жировая болезнь печени.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование не имело финансовой поддержки.
Соответствие принципам этики:	исследование одобрено этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 201 от 30.07.2020 г.).
Для цитирования:	Мустафина Л.Р., Логвинов С.В., Богданова Л.И., Курбатов Б.К. Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на морфологию печени у молодых и старых крыс. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):126–132. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-126-132 .

Effects of a high-carbohydrate high-fat diet on liver morphology in young and old rats

Liliya R. Mustafina¹, Sergey V. Logvinov^{1,2}, Liliya I. Bogdanova¹,
Boris K. Kurbatov²

¹ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Abstract

The liver is a complex metabolic organ that, through the regulation of energy metabolism, maintains the homeostasis of the whole organism.

Aim: To establish the morphological changes in hepatocytes and the expression of endothelial vascular factor in a high-carbohydrate high-fat diet (HCHFD) depending on age.

Material and Methods. A histological study of the liver was carried out in four groups of male Wistar rats: 1st group – 5-month-old animals on a standard diet; 2nd group – 5-month-old animals on HCHFD for 90 days (from 2 months of age); 3rd group – 18-month-old animals on a standard diet; 4th group – 18-month-old animals on HCHFD for 90 days (from 15 months of age). Using morphometric methods, the specific volumes (%) of unchanged and binuclear hepatocytes, sinusoidal capillaries, inflammatory infiltrates, and foci of fibrosis in the liver were determined. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cells and hepatocytes was evaluated by immunohistochemical method. The concentration of cholesterol and triglycerides was determined by the enzymatic colorimetric method in the blood serum and in the liver.

Results. A morphological study revealed a significant expansion of sinusoidal capillaries in groups 2 and 4. A statistically significant increase in the specific volume of hepatocytes with vacuolar inclusions, binuclear hepatocytes, fibrous foci and small inflammatory infiltrates was detected in the 4th group. VEGF expression increased in hepatocytes of groups 2 and 4. Biochemical study found an increase in the concentration of triglycerides in the rats' liver of the 4th group. Thus, HCHFD, despite the pronounced signs of regeneration, increased age-related changes in the liver of old rats.

Keywords:	age-related changes in the liver, high-carbohydrate high-fat diet, endothelial vascular growth factor, non-alcoholic fatty liver disease.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	the study did not have financial support
Adherence for ethical standards:	compliance with ethical principles. The study was approved by the local ethical committee of the Research Institute of Cardiology, Tomsk NIMTs (Protocol No. 201 dated July 30, 2020).
For citation:	Mustafina L.R., Logvinov S.V., Bogdanova L.I., Kurbatov B.K. Effects of a high-carbohydrate high-fat diet on liver morphology in young and old rats. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):126–132. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-126-132 .

Введение

Так называемая «фаст-фуд диета» («диета кафетерия», «западная диета»), ставшая популярной в последние десятилетия, включает большое количество натрия [1, 2], насыщенных жиров, трансжиров и быстроусваиваемых углеводов [1]. Такие продукты быстро насыщают, они относительно дешевы, но при регулярном их употреблении приводят к ожирению, развитию метаболических нарушений, вызывая серьезные проблемы со здоровьем [3]. Печень играет центральную роль в регулировании системного ответа на питание, поэтому возрастные изменения в печени могут иметь существенные системные эффекты [4, 5]. При этом страдают практически все жизненно важные органы: сердце, сетчатка, почки и т. д. Поражение печени при высоком употреблении жиров и сахара приводит к накоплению липидов в гепатоцитах, развитию стеатоза, инсулинорезистентности, а в последующем к циррозу и раку печени [6].

Цель исследования: установить морфологические изменения гепатоцитов и экспрессию фактора роста эндотелия сосудов при высокоуглеводной высокожировой диете (ВУВЖД) в зависимости от возраста.

Материал и методы

Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 60 и 450 дней. Все процедуры соответствовали Директиве Европейского парламента 2010/63/EU и заявлению FASEB о принципах использования животных в исследованиях и образовании (исследование одобрено этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ, протокол № 201 от 30.07.2020 г.).

Экспериментальные группы формировали следующим образом: группа 1 ($n = 14$) – интактные 5-месячные крысы, содержавшиеся на стандартном рационе; группа 2 ($n = 14$) – 5-месячные крысы, с 2-месячного возраста в течение 90 сут содержавшиеся на ВУВЖД (16% белков,

21% жиров, 46% углеводов, в том числе 17% фруктозы, 0,125% холестерина); группа 3 ($n = 14$) – интактные 18-месячные крысы, содержавшиеся на стандартном рационе; группа 4 ($n = 14$) – 18-месячные крысы, с 15-месячного возраста в течение 90 сут содержавшиеся на ВУВЖД. Воду заменяли 20%-м раствором фруктозы. Крысам групп 1 и 3 (интактным животным) давали стандартный корм для грызунов (белки 24%, жиры 6%, углеводы 44%) и чистую воду *ad libitum*.

Из эксперимента животных выводили путем декапитации с предварительной анестезией хлоралозой (100 мг/кг внутривенно). Перед декапитацией забирали образцы крови, которые центрифугировали (15 мин 3000 об/мин), образцы сыворотки хранили в морозильной камере при -70°C . Концентрацию холестерина и триглицеридов в биоптате печени определяли ферментативным колориметрическим методом (наборы «Вектор-бест», Россия). Для гистологического исследования образцы печени фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина (ООО «БиоВитрум», Россия) и заливали в парафин по стандартной методике. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, гематоксилином и пикрофуксином по Ван Гизону, проводили ШИК-реакцию (все красители от ООО «БиоВитрум», Россия). Иммуногистохимическую реакцию проводили с использованием моноклональных антител к фактору роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF), согласно протоколу фирмы производителя (Abcam, США). Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на световом микроскопе «Axiostar plus» (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 400 и 1000 раз. Морфометрический анализ осуществляли с помощью сетки Автандилова. При увеличении в 400 раз подсчитывали удельные объемы (%) неизмененных и двуядерных гепатоцитов, синусоидных капилляров, фиброзных изменений. Количество VEGF-позитивных клеток оценивали в 1 мм^2 среза.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., США). Полученные количественные данные проверяли на согласие распределения с нормальным законом с помощью критерия Шапиро – Уилка. Данные, соответствовавшие нормальному распределению, представляли в виде среднего и стандартной ошибки ($M \pm SEM$); при распределении, отличающемся от нормального, – в виде медианы и межквартильного интервала ($Me (Q_1; Q_3)$). Проверку на гомогенность дисперсий в группах проводили с использованием критерия Левене. При сравнении нескольких независимых, нормально распределенных выборок количественных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим применением критерия Стьюдента с поправками Бонферрони для апостериорных сравнений или непараметрический критерий Краскела – Уоллиса – для сравнения показателей в группах 1–4 и критерий Манна – Уитни – для попарных апостериорных межгрупповых сравнений показателей, распределение которых отличалось от нормального. За пороговое значение уровня значимости p принимали 0,05.

Результаты

Гистологическое исследование печени интактной группы 1 установило типичное балочное строение долек (рис. 1а), с умеренно полнокровными синусоидными капиллярами и сосудами портальных трактов, а также

центральных вен. Гепатоциты группы 1 содержали, как правило, одно ядро с хорошо заметным ядрышком. Цитоплазма клеток содержала равномерно распределенные гранулы гликогена, что выявлялось при постановке ШИК-реакции (рис. 1б).

В группе 2 наблюдались единичные мелкие очаги лимфо-моноцитарных инфильтратов, расположенных, как правило, в перисинусоидальном пространстве (рис. 1с). Центральные вены долек отличались полнокровием, периферические синусоиды – заметным расширением просвета. Гепатоциты в гранулярной цитоплазме содержали по одному ядру, встречались единичные двуядерные клетки.

В группе 3 отмечалось умеренное полнокровие сосудов портальных трактов, неравномерно выраженное полнокровие центральных вен и синусоидальных капилляров периферических зон. При этом ширина просвета синусоидов оставалась обычной. Вокруг центральных вен наблюдались прослойки соединительной ткани.

Гепатоциты сохраняли зернистую цитоплазму за счет накопления в ней гранул гликогена (рис. 1д), содержали чаще одно ядро с одним или двумя ядрышками, встречались также единичные двуядерные клетки. Небольшая доля гепатоцитов подвергалась деструктивным изменениям, содержала пикнотичные ядра в светлой гомогенной цитоплазме, изредка обнаруживались мелкие прозрачные вакуоли, которые могли появиться из-за развития дистрофических изменений гепатоцитов. Подобная морфологическая картина характерна либо для гидропической (вакуолярной), либо для жировой дистрофии [7, 8]. При окраске криостатных срезов печени суданом черным В лишь в единичных клетках выявлялись мелкие капли жира (рис. 1е).

В срезах печени группы 4 наблюдались существенные морфологические изменения со стороны сосудистого русла: синусоидные капилляры характеризовались значительным расширением и полнокровием, особенно выраженным в периферических и частично в промежуточных зонах печеночных ацинусов (рис. 1ф). В венозных сосудах портальных трактов и в центральных венах часто отмечались признаки лейкостаза. Разрастание довольно широких прослоек соединительной ткани выявлялось как периферически, так и вокруг триад (рис. 1г). В печеночной паренхиме, а также в периферической зоне и перипортально встречались очаги лимфо-моноцитарной инфильтрации. В цитоплазме гепатоцитов у крыс группы 4 обнаруживались многочисленные вакуоли разной степени выраженности: в единичных клетках ядра подвергались пикнозу, а цитоплазма полностью была выполнена крупными вакуолями (рис. 1h). Некоторая часть гепатоцитов вокруг портальных трактов уменьшалась в размерах, имела гомогенную темную цитоплазму и сморщенное ядро. При этом довольно часто встречались и двуядерные гепатоциты с гранулами гликогена в цитоплазме.

При количественном исследовании наиболее значимые изменения печеночной ткани отмечались в группах 2 и 4 (табл. 1).

Удельные объемы гепатоцитов, содержащих в цитоплазме вакуолярные включения, были наиболее выражены в группе 4 и значительно превышали показатели других исследованных групп. Гидропическая дистрофия чаще наблюдается при нарушении белкового метаболизма в печени в результате вирусного воздействия или кратковременной гипертермии [7].

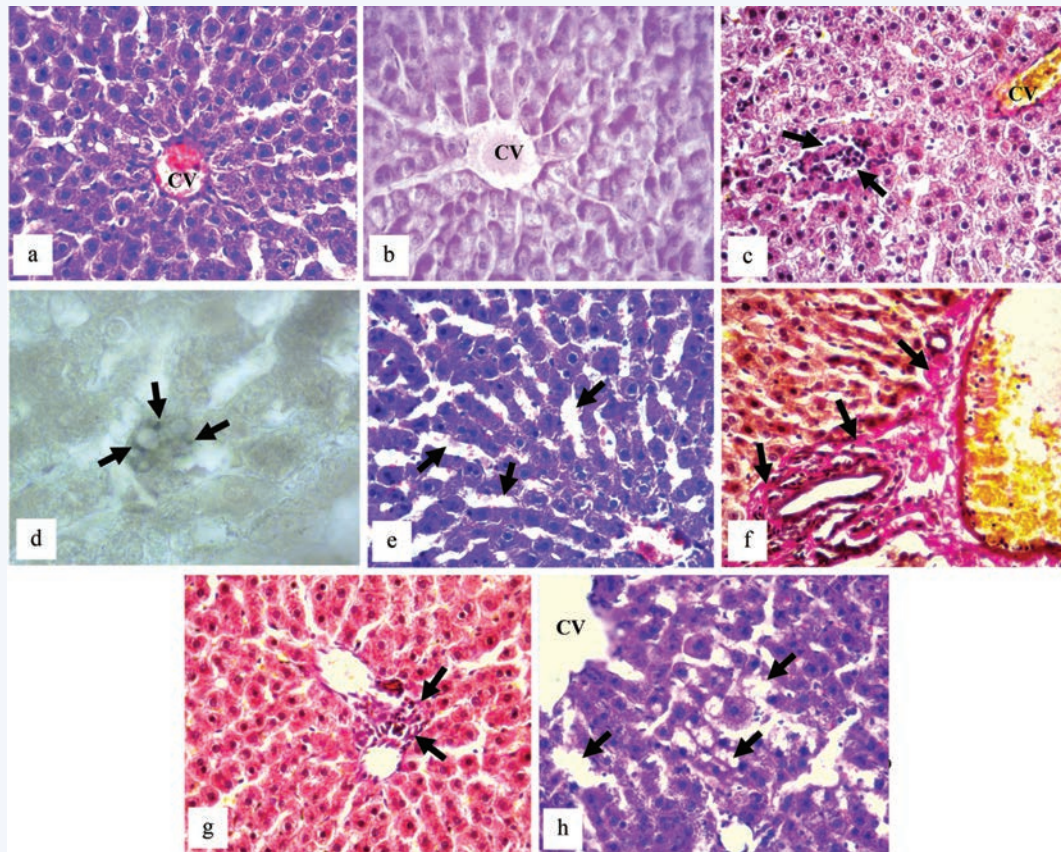


Рис. 1. Гистологические изменения печени крыс, связанные с высокоуглеводной высокожировой диетой (ЦВ – центральная вена): а – обычное строение печени, группа 1, б – равномерное распределение гранул гликогена в цитоплазме гепатоцитов, группа 1, с – мелкоочаговая лимфо-моноцитарная инфильтрация паренхимы печени, группа 2, д – мелкие липидные капли рядом с крупными судан-негативными вакуолями в цитоплазме гепатоцита (стрелки), группа 3, е – расширение синусоидальных капилляров (стрелки), группа 4, ф – мелкоочаговая лимфо-моноцитарная инфильтрация вокруг портального тракта, группа 3, г – выраженные фиброзные изменения вокруг портального тракта (стрелки), группа 4, h – мелкие и крупные вакуоли в цитоплазме гепатоцитов (стрелки), группа 4. Окраска: а, е, h – гематоксилином и эозином; б – ШИК-реакция и гематоксилин; д – суданом черным В; с, ф, г – по Ван Гизону. Увеличение: а, б, с, е, ф, г, h – $\times 400$; д – $\times 1000$

Fig. 1. Histological changes in the liver of rats associated with a high-carbohydrate high-fat diet (CV – central vein): a – normal structure of the liver, group 1, b – equal distribution of glycogen granules in the cytoplasm of hepatocytes, group 1, c – small focal lympho-monocytic infiltration of the liver parenchyma, group 2, d – small lipid droplets next to large Sudan-negative vacuoles in the cytoplasm of hepatocytes (arrows), group 3, e – expansion of sinusoidal capillaries (arrows), group 4, f – small-focal lympho-monocytic infiltration around the portal tract, group 3, g – fibrous changes around the portal tract (arrows), group 4, h – small and large vacuoles in the cytoplasm of hepatocytes (arrows), group 4. Staining: a, e, h – with hematoxylin and eosin; b – PAS-reaction and hematoxylin; d – Sudan black B; c, f, g – stain by Van Gieson. Magnification: a, b, c, e, f, g, h – $\times 400$; d – $\times 1000$

Таблица 1. Удельные объемы различных структур печеночной ткани в норме и после высокоуглеводной высокожировой диеты ($Me (Q_1-Q_3)$), %

Table 1. Specific volumes of various structures of the liver tissue in the norm and after the high-carbohydrate high-fat diet ($Me (Q_1-Q_3)$), %

Группы Groups Показатели, % Indicators, %	Крысы 5 мес. без ВУВЖД 5-month-old rats without HCHFD	Крысы 5 мес. на ВУВЖД 5-month-old rats at HCHFD	Крысы 18 мес. без ВУВЖД 18-month-old rats with- out HCHFD	Крысы 18 мес. на ВУВЖД 18-month-old rats at HCHFD
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
Гепатоциты с вакуолями в цитоплазме Hepatocytes with vacuoles in the cytoplasm	0,00 ⁴	0,15 ⁴ (0,00–0,15)	0,46 ⁴ (0,15–0,46)	3,57 ^{1,2,3} (2,38–4,76)
Двоядерные гепатоциты Binuclear hepatocytes	9,52 (4,76–14,29)	7,14 ⁴ (4,76–10,71)	5,95 (5,95–11,90)	11,90 ² (5,52–14,29)
Синусоидные капилляры Sinusoidal capillaries	16,67 ² (11,90–21,43)	26,19 ¹ (23,81–30,95)	14,29 ⁴ (14,29–26,19)	30,95 ³ (23,81–38,10)
Очаги фиброза (периваскулярные) Foci of fibrosis (perivascular)	2,38 ³ (2,38–2,38)	2,38 ⁴ (2,38–2,38)	3,57 ¹ (3,57–9,52)	9,52 ² (5,95–25,00)
Очаги клеточной инфильтрации Foci of cellular infiltration	0,00 ⁴	0,01 ⁴ (0,00–0,01)	0,03 ⁴ (0,00–0,03)	2,38 ^{1,2,3} (2,38–2,38)

Примечание: ВУВЖД – высокоуглеводная высокожировая диета, ¹ – статистическая значимость различий по сравнению с группой 1, ² – по сравнению с группой 2, ³ – по сравнению с группой 3; ⁴ – по сравнению с группой 4 при $p \leq 0,05$.

Note: HCHFD - high-carbohydrate high-fat diet, ¹ – statistical significance of differences in comparison with the 1st group; ² – compared with the 2nd group; ³ – compared with the 3rd group; ⁴ – compared with the 4th group at $p \leq 0,05$.

Жировая дистрофия может быть реакцией печени на различные токсические воздействия, метаболический синдром или может отражать возрастные изменения печени. Так, в экспериментах на стареющих мышьях накопление липидных капель в цитоплазме гепатоцитов связывалось авторами с возрастным уменьшением синтеза сосудорасширяющих факторов и провоспалительным состоянием [8].

Удельные объемы двуядерных гепатоцитов значительно повышались в группе 4, где также выявлялись клетки, подверженные вакуольной дистрофии (см. табл. 1). Это свидетельствует о высокой регенераторной способности печени, несмотря на выраженные дистрофические явления в гепатоцитах на фоне ВУВЖД. Известно, что плоидность гепатоцитов резко увеличивается во время регенерации [9]. Показано также, что при старении печени естественным образом уменьшается количество одноядерных гепатоцитов с обычными ядрами из-за снижения скорости синтеза и репарации ДНК, что сопровождается увеличением количества полиплоидных гепатоцитов [4].

Оценка фиброзных изменений установила статистически значимое разрастание соединительной ткани вокруг сосудов у интактных крыс с увеличением их возраста (см. табл. 1), тогда как у животных, находящихся на ВУВЖД, склерозу подвергались большие объемы печеночной стромы, их показатели в группе 4 увеличивались в четыре раза по сравнению с таковыми в группе 3. Среди показателей, отражающих удельные объемы кле-

точной инфильтрации, преобладали значения в группе 4. Ключевым фактором, способствующим возникновению и прогрессированию фиброза печени, является гипоксия, в свою очередь фиброз печени может еще больше усугубить степень гипоксии [10].

Значимое увеличение удельных объемов клеточной инфильтрации в группе 4 могло быть связано как с процессом старения крыс, так и с метаболическими нарушениями, вызванными назначением ВУВЖД (см. табл. 1), что не противоречит данным других исследователей. Так, при исследовании естественного старения у крыс было отмечено увеличение набора провоспалительных клеток с сопутствующим увеличением маркеров воспаления, что способствовало умеренно выраженному воспалительному процессу в печени [8].

Удельные объемы синусоидных капилляров после назначения ВУВЖД увеличивались в 1,5 раза у молодых (группа 2) и вдвое у старых крыс (группа 4) по сравнению с животными, содержащимися на обычном пищевом рационе (см. табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о нарушении венозного оттока из печеночной доли, что описано другими исследователями при изучении печени у стареющих крыс [8]. Очевидно, что назначение ВУВЖД усугубляет выявленные изменения.

Проведение иммуногистохимического исследования для выявления экспрессии VEGF позволило заметить некоторую тенденцию к ее увеличению в эндотелиальных клетках сосудов у старых крыс в группах 3 и 4 (рис. 2a, b).

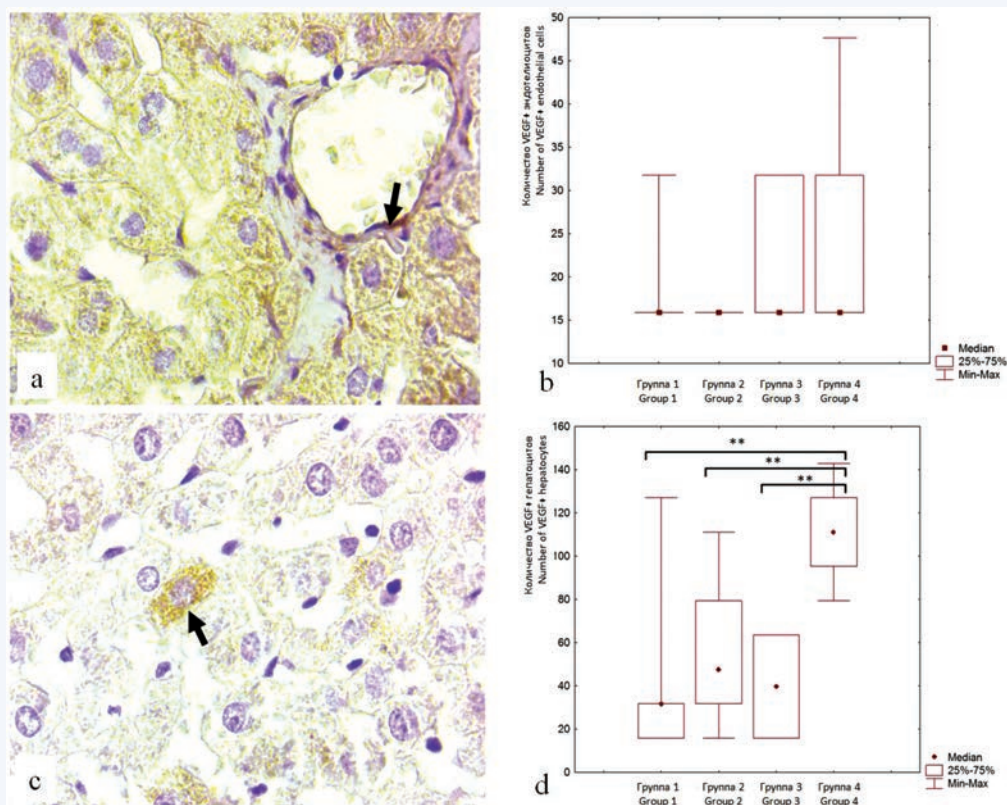


Рис. 2. Экспрессия VEGF в печени крыс: а – VEGF-позитивный эндотелиоцит, группа 4 (стрелка), б – количественное содержание VEGF-позитивных эндотелиоцитов в 1 мм², с – выраженная экспрессия VEGF в цитоплазме гепатоцита, группа 4 (стрелка), д – количественное содержание VEGF-позитивных гепатоцитов в 1 мм². ** – обозначены отличия между группами. а, с – иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами к VEGF, гематоксилин. Увеличение × 1000

Fig. 2. VEGE expression in the liver of rats: а – VEGF-positive endothelial cells (arrow), group 4, б – quantitative content of VEGF-positive endothelial cells in 1 mm², с – VEGF-positive expression in the hepatocyte cytoplasm (arrow), group 4, д – quantitative content of VEGF-positive hepatocytes per 1 mm², ** – differences between groups are indicated. а, с – immunohistochemical staining with monoclonal antibodies to VEGF, hematoxylin. Magnification × 1000

Note: VEGF – vascular endothelial growth factor.

Эндотелиальные клетки, выстилающие печеночные синусоиды, выполняют ряд важных физиологических функций, включая содействие двунаправленному переносу субстратов между кровью и гепатоцитами, эндоцитоз циркулирующих белков, регуляцию иммунотолерантности и поддержание синусоидального микроокружения [4]. С возрастом происходят существенные изменения в структуре и функции эндотелиальных клеток, которые влияют как на нормальное функционирование печени, так и на системный риск кардиометаболических заболеваний [11].

При исследовании экспрессии VEGF в эндотелиальных клетках у грызунов зрелого и старческого возраста после экспериментальной резекции 70% печени с целью оценки степени ее регенерации была выявлена более низкая экспрессия VEGF у старых животных с меньшим количеством фенестр в эндотелии сосудов [12]. Существуют также литературные данные, согласно которым никаких изменений в экспрессии VEGF в эндотелиоцитах с возрастом не наблюдается [13].

Хотя эффекты VEGF изучаются в основном в контексте физиологии сосудов, они не ограничиваются только эндотелиальными клетками. К настоящему времени выявлено несколько типов клеток (макрофаги, нейтрофилы, перитциты, холангиоциты, гепатоциты), активно экспресси-

рующих VEGF при возникновении гипоксии и участвующих в репаративных процессах в печени [14]. В проведенном нами исследовании экспрессия VEGF в гепатоцитах значительно возрастала в группе 4 и проявляла явную тенденцию к увеличению в группе 2, что указывает на повреждающее влияние назначения ВУВЖД на гепатоциты (рис. 2с, d). Согласно литературным данным, гепатоциты контролируют рост и восстановление печени после повреждения посредством высвобождения различных факторов роста, в частности VEGF [4, 15–17]. Так, в исследовании экспериментального фиброза и цирроза была установлена повышенная экспрессия VEGF в гепатоцитах, которые находились в состоянии регенерации [17]. Таким образом, полученные нами результаты еще раз подтверждают активную регенерацию печени у крыс, находившихся на ВУВЖД. Кроме того, VEGF также связан с генерацией патологического ответа, что вызывает прогрессирующее накопление компонентов внеклеточного матрикса и образование новой фиброваскулярной стромы [14], которая выявлялась в гистологической картине печени у старых крыс после назначения ВУВЖД (группа 4).

Биохимическое исследование биоптатов печени не выявило отличий в концентрации триглицеридов и холестерина между сравниваемыми группами (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация триглицеридов и холестерина в биоптате печени белых крыс, $M \pm SEM$

Table 2. The concentration of triglycerides and cholesterol in the liver biopsy of albino rats, $M \pm SEM$

Группы Groups Показатели Indicators	Крысы 5 мес. без ВУВЖД 5-month-old rats without HCHFD	Крысы 5 мес. на ВУВЖД 5-month-old rats at HCHFD	Крысы 18 мес. без ВУВЖД 18-month-old rats without HCHFD	Крысы 18 мес. на ВУВЖД 18-month-old rats at HCHCD
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
Триглицериды, мг/г Triglycerides, mg/g	8,4 ± 0,4	19,2 ± 2,2 ¹	12,9 ± 0,9	21,3 ± 3,8 ^{1, 3}
Холестерин, мг/г Cholesterol, mg/g	15,59 ± 0,3	18,0 ± 1,4	15,1 ± 0,4	17,3 ± 1,1

Примечание: ВУВЖД – высокоуглеводная высокожировая диета, ¹ – значимость различий по сравнению с группой 1, ² – по сравнению с группой 2, ³ – по сравнению с группой 3, ⁴ – по сравнению с группой 4, при $p \leq 0,05$.

Note: HCHFD - high-carbohydrate high-fat diet, 1 – statistical significance of differences in comparison with the 1st group; 2 – compared with the 2nd group; 3 – compared with the 3rd group; 4 – compared with the 4th group, at $p \leq 0,05$

Исследование аналогичных показателей в печени крыс позволило установить увеличение концентрации триглицеридов более чем вдвое в группе 2 и в полтора раза в группе 4 по сравнению с показателями крыс в группах 1 и 3 (см. табл. 2). Концентрация холестерина в печени у животных всех исследованных групп не изменялась.

Полученные биохимические данные не противоречат таковым, представленным в литературных источниках. Так, экспериментальное назначение свиньям диеты с высоким содержанием жиров приводило к нарушениям липидного обмена, накоплению липидов в печени (более высокие концентрации холестерина и триглицеридов), нарушению функции печени (более высокие уровни АЛТ и АСТ в сыворотке крови), окислительному стрессу и, как следствие, повышению уровня перекисного окисления

липидов, что связывалось с апоптозом гепатоцитов и, по мнению исследователей, соответствовало клиническими симптомам неалкогольной жировой болезни печени человека [18].

Заключение

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют не только о возрастных изменениях функции печени, но также и о ее нарушениях при назначении ВУВЖД, что вызывает значительное повреждение как стромы, так и паренхимы печени, способствуя развитию дистрофических, фиброзных и воспалительных изменений. Менее выраженные морфологические изменения печени после назначения ВУВЖД молодым крысам, вероятно, связаны с ее высокой регенераторной способностью.

Литература / References

1. Tapsell L.C., Neale E.P., Satija A., Hu F.B. Foods, Nutrients, and dietary patterns: interconnections and implications for dietary guidelines. *Adv. Nutr.* 2016;7(3):445–454. DOI: 10.3945/an.115.011718.

2. GBD 2017 Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2019;393(10184):1958–1972. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30041-8.

3. Elizabeth L., Machado P., Zinöcker M., Baker P., Lawrence M. Ul-

- tra-processed foods and health outcomes: A narrative review. *Nutrients*. 2020;12(7):1955. DOI: 10.3390/nu12071955.
- Hunt N.J., Kang S.W.S., Lockwood G.P., Le Couteur D.G., Cogger V.C. Hallmarks of aging in the liver. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019;17:1151–1161. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.07.021.
 - Drożdż K., Nabrdalik K., Hajzler W., Kwiendacz H., Gumprecht J., Lip G.Y.H. Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD), diabetes, and cardiovascular disease: associations with fructose metabolism and gut microbiota. *Nutrients*. 2021;14(1):103. DOI: 10.3390/nu14010103.
 - Ipsen D.H., Lykkesfeldt J., Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018;75(18):3313–3327. DOI: 10.1007/s00018-018-2860-6.
 - Vlad M., Ionescu N., Ispas A.T., Giuvărășteanu I., Ungureanu E., Stoica C. Morphological changes during acute experimental short-term hyperthermia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2010;51(4):739–744.
 - Maeso-Díaz R., Ortega-Ribera M., Fernández-Iglesias A., Hide D., Muñoz L., Hessheimer A.J. et al. Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. *Aging Cell.* 2018;17(6):e12829. DOI: 10.1111/acel.12829.
 - Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr. Biol.* 2012;22(13):1166–1175. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.016.
 - Cai J., Hu M., Chen Z., Ling Z. The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis. *J. Transl. Med.* 2021;19(1):186. DOI: 10.1186/s12967-021-02854-x.
 - Le Couteur D.G., Lakatta E.G. A vascular theory of aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2010;65(10):1025–1027. DOI: 10.1093/geronol/g1q135.
 - Wang W.L., Zheng X.L., Li Q.S., Liu W.Y., Hu L.S., Sha H.C. et al. The effect of aging on VEGF/VEGFR2 signal pathway genes expression in rat liver sinusoidal endothelial cell. *Mol. Cell. Biochem.* 2021;476(1):269–277. DOI: 10.1007/s11010-020-03903-7.
 - Cheluvappa R., Hilmer S.N., Kwun S.Y., Jamieson H.A., O'Reilly J.N., Muller M. et al. The effect of old age on liver oxygenation and the hepatic expression of VEGF and VEGFR2. *Exp. Gerontol.* 2007;42(10):1012–1019. DOI: 10.1016/j.exger.2007.06.001.
 - Mariotti V., Fiorotto R., Cadamuro M., Fabris L., Strazzabosco M. New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Rep.* 2021;3(3):100251. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100251.
 - Adas G., Koc B., Adas M., Duruksu G., Subasi C., Kemik O. et al. Effects of mesenchymal stem cells and VEGF on liver regeneration following major resection. *Langenbecks Arch. Surg.* 2016;401(5):725–740. DOI: 10.1007/s00423-016-1380-9.
 - Kambakamba P., Linecker M., Schneider M., Kron P., Limani P., Tschuur C. et al. Novel benefits of remote ischemic preconditioning through VEGF-dependent protection from resection-induced liver failure in the mouse. *Ann. Surg.* 2018;268(5):885–893. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002891.
 - Lee A.R., Baek S.M., Lee S.W., Kim T.U., Han J.E., Bae S. et al. Nuclear VEGFR-2 expression of hepatocytes is involved in hepatocyte proliferation and liver regeneration during chronic liver injury. *In Vivo.* 2021;35(3):1473–1483. DOI: 10.21873/invivo.12400.
 - Wang P., Lu Z., He M., Shi B., Lei X., Shan A. The effects of endoplasmic-reticulum-resident selenoproteins in a nonalcoholic fatty liver disease pig model induced by a high-fat diet. *Nutrients*. 2020;12(3):692. DOI: 10.3390/nu12030692.

Информация о вкладе авторов

Мустафина Л.Р. – иммуногистохимическое исследование, подготовка иллюстративного материала, морфологической части текста статьи и оформление окончательного варианта рукописи.

Логвинов С.В. – разработка концепции, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

Богданова Л.И. – окраска срезов, морфометрический подсчет, статистическая обработка данных.

Курбатов Б.К. – моделирование метаболического синдрома у крыс, забор и обработка биологического материала для биохимических исследований, проведение биохимических исследований, разработка концепции статистической обработки данных.

Сведения об авторах

Мустафина Лилия Рамильевна, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3526-7875.

E-mail: irmustafina@yandex.ru.

Логвинов Сергей Валентинович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации; старший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-9876-6957.

E-mail: s_logvinov@mail.ru.

Богданова Лилия Игоревна, студент 4-го курса, лечебный факультет, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-3540-027X.

E-mail: liybogdanovaa@gmail.com.

Курбатов Борис Константинович, младший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9603-822X.

E-mail: bobersanker@gmail.com.

Мустафина Лилия Рамильевна, e-mail: irmustafina@yandex.ru.

Information on author contributions

Mustafina L.R. – immunohistochemical study, preparation of illustrative material and design of the final version of the manuscript.

Logvinov S.V. – development of the concept, preparation of the morphological part of the text, substantiation of the manuscript, verification of critically intellectual content and final approval of the manuscript for publication.

Bogdanova L.I. – section staining, morphometric counting, statistical data processing.

Kurbatov B.K. – modeling of the metabolic syndrome in rats, sampling and processing of biological material for biochemical studies, conducting biochemical studies, developing the concept of statistical data processing.

Information about the authors

Liliya R. Mustafina, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Histology, Embryology, and Cytology, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-3526-7875.

E-mail: irmustafina@yandex.ru.

Sergey V. Logvinov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Histology, Embryology, and Cytology, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Senior Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-9876-6957.

E-mail: s_logvinov@mail.ru.

Liliya I. Bogdanova, 4th year student, Medical Faculty, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-3540-027X.

E-mail: liybogdanovaa@gmail.com.

Boris K. Kurbatov, Junior Research Scientist, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-9603-822X.

E-mail: bobersanker@gmail.com.

Liliya R. Mustafina, e-mail: irmustafina@yandex.ru.

Received January 13, 2023

Поступила 13.01.2023

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-133-139>
УДК 616-009.7-036.12:616-006]-021.6-02:616.831-07:577.175.823

Анализ изменения коэффициента инактивации серотонина в структурах головного мозга при одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии

И.М. Котиева¹, Е.М. Франциянц², С.В. Шлык¹, Н.В. Дроботя¹, М.В. Гулян¹,
М.А. Додохова¹

¹ Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344037, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Аннотация

Введение. Хронический болевой синдром при развитии злокачественных новообразований имеет сложный полиэтиологический характер. Изучение патогенетических механизмов боли на фоне роста перевиваемой опухоли в эксперименте может открыть широкие перспективы для создания новых отечественных анальгезирующих препаратов для применения в онкологии. Цель исследования: изучить коэффициент инактивации серотонина (КИС) – соотношение серотонина (S) и его основного метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (S-OH) в зонах головного мозга (кора, гипоталамус) при одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии.

Материал и методы. Работа проведена на белых беспородных крысах (самцах). Для создания модели хронической боли (ХБ) было выполнено лигирование седалищного нерва по методике В.В. Кравцова в модификации. Для моделирования злокачественной неоплазии была использована крысиная саркома М-1. На основном этапе исследования животные были разделены на 4 группы: контрольная, две группы сравнения (модельная хроническая боль, стандартная перевивка саркомы М-1), опытная (сочетанное моделирование ХБ и онкологического процесса). Животные второй, третьей и четвертой группы подвергались эвтаназии последовательно на 2-й и 3-й нед. развития опухолевого процесса.

Результаты. Хронический болевой синдром нарушает процесс обмена серотонина: снижение КИС в коре головного мозга экспериментальных животных было более значительным на 48% (14-е сут) и 72% (21-е сут). Развитие онкологического процесса в группах сравнения (группы 3а и 3б) сопровождается снижением уровня КИС, более выраженным на 21-е сут развития саркомы М-1: в гипоталамусе – на 37%, в коре головного мозга – на 41%. При одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии отмечены самые низкие значения исследуемого показателя, уменьшение составило в коре головного мозга 75% (группа 4а) и 87% (группа 4б).

Обсуждение. Хроническая нейрогенная боль и развитие саркомы М-1 в изолированных вариантах моделирования вызывают значительное снижение КИС в гипоталамусе и коре головного мозга за счет нарушений образования серотонина. Более выраженный срыв работы серотониновой медиаторной системы отмечен в коре головного мозга, что приводит к снижению адаптационных возможностей организма к боли и нарушению регуляторных механизмов метаболизма.

Выводы. Модификация обмена серотонина может рассматриваться в качестве потенциальной терапевтической мишени для лечения хронического болевого синдрома в онкологии.

Ключевые слова:	хроническая нейрогенная боль, саркома М-1, серотонин, 5-оксииндолуксусная кислота, злокачественные новообразования.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.
Соответствие принципам этики:	исследование одобрено биоэтическим комитетом по работе с животными Национального медицинского исследовательского центра онкологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 4 от 10.08.2018 г.).

Додохова Маргарита Авдеевна, e-mail: dodohova@mail.ru.

Для цитирования:

Котиева И.М., Франциянц Е.М., Шлык С.В., Дробота Н.В., Гулян М.В., Додохова М.А. Анализ изменения коэффициента инактивации серотонина в структурах головного мозга при одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2023;38(1):133–139. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-133-139>.

Analysis of changes in the serotonin inactivation coefficient in brain structures with simultaneous modeling of chronic neurogenic pain and malignant neoplasia

Inga M. Kotieva¹, Elena M. Frantsiyants², Sergey V. Shlyk¹, Natalia V. Drobotya¹, Marina V. Gulyan¹, Margarita A. Dodokhova¹

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,

29, Nakhichevan lane, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation

²National Medical Research Centre for Oncology,

63, Liniya 14, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

Abstract

Introduction. Chronic pain syndrome in the development of malignant neoplasms has a complex polyetiological character. The study of the pathogenetic mechanisms of pain during the growth of the transplanted tumor in the experiment can open up broad perspectives for the creation of new domestic analgesic drugs for use in oncology.

Aim: To study the serotonin inactivation coefficient (SIC), the ratio of serotonin (S) and its main metabolite 5-hydroxyindolacetic acid (S-OH) in brain areas (cortex, hypothalamus) with simultaneous modeling of chronic neurogenic pain and malignant neoplasia.

Material and Methods. The study involved white mongrel rats (males). To create a model of chronic pain (CP), ligation of the sciatic nerve was performed according to the method of V.V. Kravtsova in modification. Rat sarcoma M-1 was used to simulate malignant neoplasia. At the main stage of the study, the animals were divided into 4 groups: control, two comparison groups (model of chronic pain, standard M-1 sarcoma grafting) and experimental (combined modeling of CP and oncological process). Animals of the second, third and fourth groups were euthanized sequentially at the 2nd and 3rd weeks of the development of the tumor process.

Results. Chronic pain syndrome disrupts the process of serotonin metabolism: the decrease in SIC in the cerebral cortex of experimental animals was more significant by 48% (day 14) and 72% (day 21). The development of the oncological process in comparison groups (groups 3a and 3b) is accompanied by a decrease in the level of SIC, more significant at the 21st day of M-1 sarcoma development: by 37% in the hypothalamus, by 41% in the cerebral cortex. With simultaneous modeling of chronic neurogenic pain and malignant neoplasia, the lowest values of the studied indicator were noted, the decrease was 75% in the cerebral cortex (group 4a) and 87% (group 4b).

Discussion. Chronic neurogenic pain and M-1 sarcoma development in isolated modeling variants cause a significant decrease in SIC in hypothalamus and cerebral cortex due to disorders of serotonin formation. A more significant disruption of the serotonin mediator system was noted in cerebral cortex which leads to a decrease in the body's adaptive capabilities to pain and a disruption of the regulatory mechanisms of metabolism.

Conclusion. Modification of serotonin metabolism can be considered as a potential therapeutic target for the treatment of chronic pain syndrome in oncology.

Keywords:	chronic neurogenic pain, M-1 sarcoma, serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid, malignant neoplasms.
Conflict of interest:	the authors declare no conflicts of interests.
Financial disclosure:	the study was not supported by any external sources of funding.
Adherence to ethical standards:	the study was approved by the National Medical Research Center for Oncology, Bioethical Committee for Working with Animals (Protocol No. 4 of 10.08.2018).

For citation:

Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Shlyk S.V., Drobotya N.V., Gulyan M.V., Dodokhova M.A. Analysis of changes in the serotonin inactivation coefficient in brain structures with simultaneous modeling of chronic neurogenic pain and malignant neoplasia. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2023;38(1):133–139. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-133-139>.

Введение

Хронический болевой синдром при развитии злокачественных новообразований имеет сложный полиэтиологический характер: боль может быть вызвана самой опухолью (поражение костей, мягких тканей, кожи, внутренних органов, окклюзия сосудов и др.), осложнениями опухолевого роста (патологический перелом, некроз, изъязвление, воспаление, инфицирование тканей и органов, тромбозы), а также боль может быть обусловлена противоопухолевым лечением (фантомная боль, боли при спайках, рубцах, отеках, полинейропатия, генерализованная миалгия, астенический некроз, артралгии, микозиты, поражение кожи и слизистых оболочек, костей, фиброз, неврит, плексит, миелопатия и др.) [1]. В настоящее время хроническая боль (ХБ) в онкологии активно исследуется как самостоятельная форма болезни. В результате формирования хронического болевого синдрома происходит нарушение нормальной работы не только первичных периферических сенсорных нейронов, но и нейронов спинного и головного мозга, что проявляется в изменении синаптической передачи, формировании новых патологических синаптических схем [2, 3], морфофункциональные изменения структур периферической и центральной нервной системы (ЦНС) [4].

Для облегчения хронического болевого синдрома в онкологии применимо последовательное использование анальгетиков разных групп – от ненаркотических до опиоидов в соответствии с трехступенчатой «лестницей обезболивания» Всемирной организации здравоохранения [1].

Изучение патогенетических механизмов боли на фоне роста перевиваемой опухоли в эксперименте может открыть широкие перспективы для создания новых комбинированных отечественных препаратов для сопроводительной терапии хронического болевого синдрома в онкологической практике.

Цель исследования: изучение коэффициента инактивации серотонина (КИС) – соотношения серотонина (S) и его основного метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (S-OH) в зонах головного мозга (кора, гипоталамус) при одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии.

Материал и методы

Работа проведена на 56 экспериментальных животных белых беспородных крысах (самцах) массой 180–220 г (табл. 1).

Для создания модели ХБ было выполнено лигирование седалищного нерва по методике В.В. Кравцова в модификации [5]. Лигирование проводили под ксило-золетилловым наркозом, через 14 дней после заживления послеоперационной раны начинали основной этап эксперимента. В этот период у них развивалась 3-я фаза ХБ, соответствующая периоду дезорганизации функционирования моноаминовой системы в условиях «хронизации» болевого синдрома.

Для моделирования злокачественной неоплазии была использована крысиная саркома М-1 (внутривенное введение опухолевых клеток от крысы донора – 0,5 мл взвеси опухолевых клеток саркомы М-1 в физиологическом растворе в разведении (1*10⁶/л)).

На основном этапе исследования животные были разделены на 4 группы: контрольная (группа 1), две группы сравнения (ХБ – группа 2, стандартная перевивка саркомы М-1 – группа 3), опытная (сочетанное моделирование ХБ и онкологического процесса – группа 4). Животные групп 2, 3, 4 подвергались эвтаназии последовательно на 2-й (подгруппа а) и 3-й (подгруппа б) нед. развития опухолевого процесса. В каждой подгруппе количество животных было одинаковым и составляло 8 особей.

Таблица 1. Дизайн проведенного исследования

Table 1. Study design

Группы животных/Сутки наблюдения Animal group/Observation day	14 суток 14 days	21 сутки 21 days
Контроль (интактные животные) Control (intact animals)	1 (n = 8)	
Группа 2 – группа сравнения (боль) Comparison group 2 (pain)	2a (n = 8)	2b (n = 8)
Группа 3 – группа сравнения (саркома М-1) Comparison group 3 (M-1 sarcoma)	3a (n = 8)	3b (n = 8)
Группа 4 – опытная группа (боль + саркома М-1) Group 4 experienced group (pain + sarcoma M-1)	4a (n = 8)	4b (n = 8)

Биогенные амины: серотонин (S) и 5-гидроксииндолуксусную кислоту (S-OH) в структурах головного мозга исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА, IBL International, Germany).

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы STATISTICA 10,0 с определением средних значений с указанием стандартных отклонений. Нормальность распределения оценивали с помощью модифицированной версии метода Колмогорова – Смирнова, а именно по методике Андерсона – Дарлинга. Оценку достоверности различий между сравниваемыми параметрами проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Сравнение групп производили попарно. Существенными считали различия при *p* < 0,05.

Все исследования проводили в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Результаты

КИС в структурах головного мозга при одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии представлены в таблице 2.

Таблица 2. Соотношение серотонина (S)/5-гидроксииндолуксусной кислоты (S-OH) в гипоталамусе и коре головного мозга экспериментальных животных

Table 2. The ratio of serotonin (S)/5-hydroxyindolacetic acid (S-OH) in the hypothalamus and the cerebral cortex of experimental animals

Группы животных Animal groups	Кора Cortex	Гипоталамус Hypothalamus
Группа 1 (контроль) Group 1 (control)	2,87	2,55
Группа 2а группа сравнения (боль), 14 сут Group 2a comparison group (pain), 14 days	1,68 ¹	2,36
Группа 2б группа сравнения (боль), 21 сут Group 2b comparison group (pain), 21 days	0,82 ^{1,2}	2,12 ^{1,2}
Группа 3а группа сравнения (саркома М-1), 14 сут Group 3a comparison group (sarcoma M-1), 14 days	2,58	2,14 ¹
Группа 3б группа сравнения (саркома М-1), 21 сут Group 3b comparison group (sarcoma M-1), 21 days	1,7 ^{1,2}	1,62 ^{1,2}
Группа 4а (боль + саркома М-1), 14 сут Group 4a (pain + sarcoma M-1), 14 days	0,72 ¹	1,81 ¹
Группа 4б (боль + саркома М-1), 21 сут Group 4b (pain + sarcoma M-1), 21 days	0,34 ^{1,2}	1,43 ^{1,2}

Примечание. 1 – достоверные отличия ($p \leq 0,05$) относительно соответствующего контроля, 2 – достоверные отличия ($p \leq 0,05$) относительно показателей в предыдущий срок исследования.

Note. 1 – significant differences ($p \leq 0,05$) in relation to the corresponding control; 2 – significant differences ($p \leq 0,05$) in relation to the indicators in the previous period of the research.

При анализе полученных результатов установлено, что хронический болевой синдром нарушает процесс обмена серотонина: снижение КИС в коре головного мозга экспериментальных животных было более значительным на 48% (14-е сут) и 72% (21-е сут).

Развитие онкологического процесса в группах сравнения (3а и 3б) сопровождается снижением уровня КИС, более выраженным на 21-е сут развития саркомы М-1: в гипоталамусе – на 37%, коре головного мозга – на 41%.

При одновременном моделировании хронической нейрогенной боли и злокачественной неоплазии отмечены самые низкие значения исследуемого показателя, уменьшение составило в коре головного мозга 75% (группа 4а) и 87% (группа 4б).

Обсуждение

В современной литературе опубликовано множество исследований о влиянии хронического болевого синдрома различной этиологии на функционально-метаболическое состояние отдельных структур головного мозга, отвечающих за ноцицептивную передачу сигналов [6]. ХБ рассматривается как стрессовая реакция, и при ее длительном воздействии происходит истощение как свободного пула аминокислотпредшественников, так и синтетических систем образования серотонина [7]. Изменения в обмене серотонина и его метаболитов ведут к нарушению психоэмоционального состояния [8], что, в

свою очередь, усугубляет несостоятельность эндогенной антиноцицептивной системы [9], что требует фармакологической коррекции [10] и дальнейшего изучения клинической применимости селективных ингибиторов обратного захвата серотонина в качестве сопроводительной терапии злокачественных новообразований [11].

При анализе полученных нами результатов стало очевидно, что при формировании хронического болевого синдрома нарушается образование серотонина из триптофана (рис. 1), наиболее вероятно, на этапе декарбоксилирования при истощении пула перидоксальфосфата [12], которое связано с увеличенным потреблением данного кофермента опухолевыми клетками.

Также возможна активизация альтернативного кинуренинового пути (см. рис. 1) превращения триптофана со снижением уровня серотонина [13, 14]. Воспаление, по-видимому, является одним из основных катализаторов переключения с синтеза серотонина на кинурениновый путь, поскольку провоспалительные цитокины индуцируют активность ферментов идоламин 2,3-диоксигеназы (IDO) и триптофан 2,3-диоксигеназы (TDO), которая обычно низкая в базальных условиях [15]. Несбалансированный кинурениновый путь вовлечен в патомеханизмы различных заболеваний, включая ишемическую болезнь сердца [16]. Истощение пула серотонина приводит к нарушению процесса торможения ноцицептивной передачи и срыву адаптационных возможностей организма. В работах У. Хи показано, что индуцированная повреждением седативного нерва гиперальгезия может быть ослаблена ингибиторами моноаминоксидазы типа А [17], что косвенно подтверждает наши результаты.

Дезорганизация серотониновой медиаторной системы более значима в коре головного мозга, нежели в гипоталамусе. На 21-е сут наблюдения в группах сравнения и опыта (2б, 3б, 4б) отмечается срыв приспособительной реакции серотониновой системы к длительному ноцицептивному стимулу, более выраженный при сочетанном моделировании нейропатической боли и опухолевого процесса. Нарушение серотонинового медиаторного обмена может модулировать биологическое поведение злокачественного новообразования [18–20].

Истощение пула серотонина снижает адаптивные и защитные возможности организма к факторам агрессии опухоли и играет большую роль в активации процесса диссеминации опухолевых клеток с формированием вторичных очагов злокачественного роста.

Выводы

Развитие хронического болевого синдрома и опухолевого процесса оказывают взаимное потенцирующее влияние с активизацией обоих процессов. Динамика изменений серотонина и его метаболита в коре головного мозга экспериментальных животных с развитием саркомы М-1 на фоне ХБ позволяет охарактеризовать возможные механизмы снижения его концентрации: истощение пула предшественников и необходимых для синтеза метаболитов и активацию кинуренинового пути превращения триптофана. Полученные нами данные в перспективе позволят разработать новые комбинированные лекарственные препараты (анальгетики, антидепрессанты, витамины группы В) для снижения интенсивности хронического болевого синдрома при терапии злокачественных новообразований.

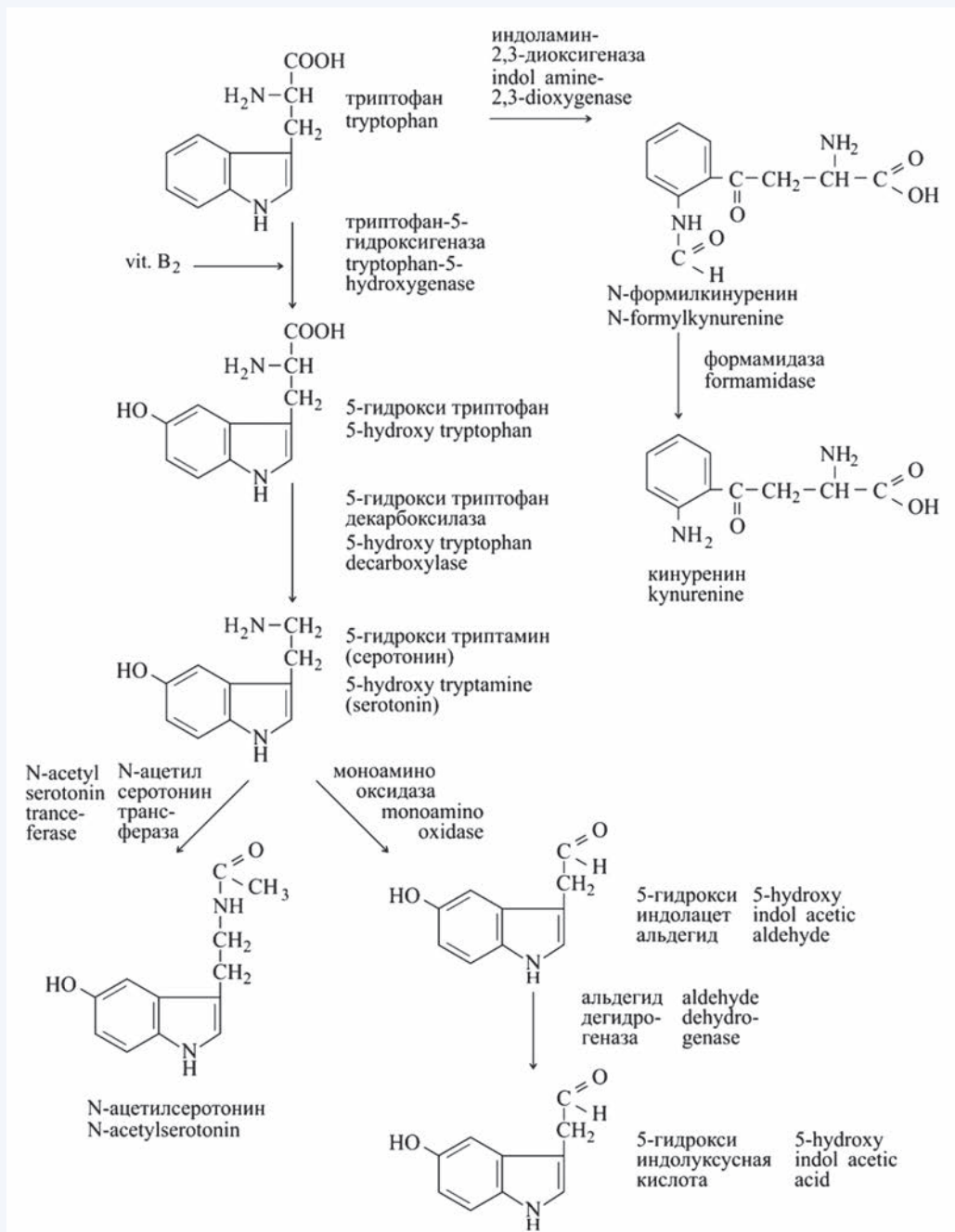


Рис. 1. Схема обмена серотонина в ткани головного мозга экспериментальных животных
 Fig. 1. The scheme of serotonin metabolism in the brain tissue of experimental animals

Литература / References

1. Когония Л.М., Новиков Г.А., Орлова Р.В., Сидоров А.В., Королева И.А., Сакаева Д.Д. Практические рекомендации по лечению хронического болевого синдрома у взрослых онкологических больных. *Злокачественные опухоли*. 2021;11(3S2-2):167–186. [Kogonia L.M., Novikov G.A., Orlova R.V., Sidorov A.V., Koroleva I.A., Sakaeva D.D. Practical recommendations for the treatment of chronic pain syndrome in adult cancer patients. *Malignant Tumors*. 2021;11(3S2-2):167–186. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-3s2-49.]
2. Игонькина С.И. Модуляция невропатической боли антителами к нейромедиаторам. *Российский журнал боли*. 2011;(2(31)):9–12. [Igonkina S.I. Modulation of neuropathic pain by antibodies to neurotransmitters. *Russian Journal of Pain*. 2011;(2(31)):9–12. (In Russ.). URL: <https://painrussia.ru/russian-Journal-of-Pain/31%2011.pdf> (15.12.2022).]
3. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Структурная и нейромедиаторная организация различных отделов коры головного мозга. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2018;17(2):85–92. [Bon E.I., Zimatkin S.M. Structural and neurotransmitter organization of various departments of the cerebral cortex. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*. 2018;17(2):85–92. (In Russ.). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/strukturnaya-i-neyromediatornaya-organizatsiya-razlichnyh-otdelov-kory-golovnogo-mozga.pdf> (15.12.2022).]
4. Maffiet A., Leysen L., Pas R., Kuppens K., Nijs J., Van Wilgen P. et al. Modern pain neuroscience in clinical practice: used for post-cancer, pediatric and sports pain. *Braz. J. Phys. Ther.* 2017;21(4):225–232. DOI: 10.1016/j.bjpt.2017.05.009.

- Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитики Л.К., Котиева И.М. Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы В16 у мышей. Патент на изобретение RU 2650587 C1, 16.04.2018. Заявка № 2017114818 от 26.04.2017. [Kit O.I., Franzants E.M., Kaplieva I.V., Trepitiki L.K., Kotieva I.M. A method of modification by chronic pain of malignant growth of melanoma B16 in mice. Patent for the invention RU 2650587 C1, 04/16/2018. Application no. 2017114818 dated 04/26/2017. (In Russ.).]
- Слепушкин В.Д., Колесников А.Н., Саламов Р.З., Калоева С.К., Цориев Г.В. Активация компонентов антиноцицептивной системы как способ снижения назначения опиоидов в периоперационном периоде. *Вестник неотложной и восстановительной хирургии*. 2021;6(10):150–161. [Slepushkin V.D., Kolesnikov A.N., Salamov R.Z., Kaloeva S.K., Tsooriev G.V. Activation of antinociceptive system components as a way to reduce opioid prescribing in the perioperative period. *Bulletin of Emergency and Reconstructive Surgery*. 2021;6(10):150–161. (In Russ.).]
- Кривопапов С.А., Юшков Б.Г., Быкова М.Ю., Забегалов К.Н. Половые отличия пула свободных аминокислот-нейромедиаторов у крыс Крушинского-Молодкиной. *Биомедицинская химия*. 2020;66(2):124–129. [Krivopalov S.A., Yushkov B.G., Bykova M.Yu., Zabegalov K.N. Sexual differences in the pool of free amino acids-neurotransmitters in Krushinsky-Molodkina rats. *Biomedical Chemistry*. 2020;66(2):124–129. (In Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20206602124.
- Синцова С.В., Вотинцев А.Е. Психологические аспекты отношения к боли при соматических заболеваниях. *Российский журнал боли*. 2020;18(СВ):90–91. [Sintsova S.V., Votintsev A.E. Psychological aspects of the attitude to pain in somatic diseases. *Russian Journal of Pain*. 2020;18(SI):90–91. (In Russ.). URL: <https://painrussia.ru/russian-Journal-of-Pain/SE%2020.pdf> (15.12.2022).
- Tamano R., Ishida M., Asaki T., Hasegawa M., Shinohara S. Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neurosci. Lett*. 2016;(615):78–82. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.025.
- Сиволап Ю.П. Ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина в психиатрии и неврологии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(8):141–146. [Sivolap Yu.P. Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors in psychiatry and neurology. *Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*. 2021;121(8):141–146. (In Russ.). DOI: 10.17116/jnev-ro2021121081141.
- Schneider M.A., Heeb L., Beffinger M.M., Pantelyushin S., Linecker M., Roth L. et al. Attenuation of peripheral serotonin inhibits tumor growth and enhances immune checkpoint blockade therapy in murine tumor models. *Sci. Transl. Med*. 2021;13(611):eabc8188. DOI: 10.1126/scitranslmed.abc8188.
- Fields A.M., Welle K., Ho E.S., Mesaros C., Susiarjo M. Vitamin B6 deficiency disrupts serotonin signaling in pancreatic islets and induces gestational diabetes in mice. *Commun. Biol*. 2021;4:421. DOI: 10.1038/s42003-021-01900-0.
- Schwarzc R., Stone T.W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. 2017;112(Pt B):237–247. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.003.
- Yan Z., Rein B. Mechanisms of synaptic transmission dysregulation in the prefrontal cortex: pathophysiological implications. *Mol. Psychiatry*. 2022;27(1):445–465. DOI: 10.1038/s41380-021-01092-3.
- Lovelace M.D., Varney B., Sundaram G., Lennon M.J., Lim C.K., Jacobs K. et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology*. 2017;112(Pt B):373–388. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.024.
- Gáspár R., Halmi D., Demján V., Berkecz R., Pipicz M., Csont T. Kynurenine Pathway Metabolites as Potential Clinical Biomarkers in Coronary Artery Disease. *Front. Immunol*. 2022;12:768560. DOI: 10.3389/fimmu.2021.768560.
- Xu Y., Lin D., Yu X., Xie X., Wang L., Lian L. et al. Antinociceptive action of ferulic acid on neuropathic pains: involvement of the descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget*. 2016;7:20455–20468. DOI: 10.18632/oncotarget.7973.
- Li S., Sun Y., Gao D. Role of the nervous system in cancer metastasis (Review). *Oncol. Letters*. 2013;5(4):1101–1111. DOI: 10.3892/ol.2013.1168.
- Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В., Каплиев А.В., Шумарин А.Е., Котиева И.М. и др. Антиноцицептивная система. Эндогенные механизмы обезболивания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019;63(4):130–136. [Ovsyannikov V.G., Boychenko A.E., Alekseev V.V., Kapliev A.V., Shumarin A.E., Kotieva I.M. et al. Antinociceptive system. Endogenous mechanisms of analgesia. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2019;63(4):130–136. (In Russ.). DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.130-136.
- Balakrishna P., George S., Hatoum H., Mukherjee S. Serotonin Pathway in Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(3):1268–1274. DOI: 10.3390/ijms22031268.

Информация о вкладе авторов

Котиева И.М., Франциянц Е.М., Шлык С.В. – концепция и дизайн исследования.

Гулян М.В., Додохова М.А. – сбор и статистическая обработка материала.

Котиева И.М., Дроботы Н.В. – написание текста.

Котиева И.М., Шлык С.В., Франциянц Е.М. – редактирование.

Все авторы – утверждение окончательного варианта статьи.

Information on author contributions

Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Shlyk S.V. – study concept and design. Gulyan M.V., Dodokhova M.A. – collection and statistical processing of material.

Kotieva I.M., Droboty N.V. – writing the text.

Kotieva I.M., Shlyk S.V., Frantsiyants E.M. – editing.

All authors – approval of the final version of the manuscript.

Сведения об авторах

Котиева Инга Мовлиевна, д-р мед. наук, профессор кафедры патологической физиологии, проректор по научной работе, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-2796-9466.

E-mail: kukulik70@mail.ru.

Франциянц Елена Михайловна, д-р биол. наук, профессор, заместитель генерального директора по науке, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3618-6890.

E-mail: super.gormon@yandex.ru.

Шлык Сергей Владимирович, д-р мед. наук, профессор, ректор Ростовского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3070-8424.

E-mail: sshlyk@mail.ru.

Information about the authors

Inga M. Kotieva, Dr. Sci. (Med.), Professor of Pathological Physiology Department, Vice-Chancellor on Scientific Research of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Rostov State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-2796-9466.

E-mail: kukulik70@mail.ru.

Elena M. Frantsiyants, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Deputy General Director of Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Centre for Oncology” of the Ministry of Health, Russia. ORCID 0000-0003-3618-6890.

E-mail: super.gormon@yandex.ru.

Sergey V. Shlyk, Dr. Sci. (Med.), Professor, Rector of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Rostov State Medical

Дроботя Наталья Викторовна, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой кардиологии, ревматологии и функциональной диагностики, проректор по учебной работе, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-6373-1615.

E-mail: drobotya@yandex.ru.

Гулян Марина Владимировна, канд. мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-6023-8916.

E-mail: 25marinablik@mail.ru.

Додохова Маргарита Авдеевна, канд. мед. наук, доцент кафедры биомедицины и психофизиологии, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3104-827X.

E-mail: dodohova@mail.ru.

✉ **Додохова Маргарита Авдеевна**, e-mail: dodohova@mail.ru.

Поступила 03.08.2022

University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-3070-8424.

E-mail: sshlyk@mail.ru.

Natalia V. Drobotya, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department of Cardiology, Rheumatology and Functional Diagnostics, Vice-Chancellor on Educational Work of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-6373-1615.

E-mail: drobotya@yandex.ru.

Marina V. Gulyan, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of Pathological Physiology Department of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Rostov State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-6023-8916.

E-mail: 25marinablik@mail.ru.

Margarita A. Dodokhova, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Biomedicine and Psychophysiology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Rostov State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-3104-827X.

E-mail: dodohova@mail.ru.

✉ **Margarita A. Dodokhova**, e-mail: dodohova@mail.ru.

Received August 03, 2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-140-150>
УДК 612.115:547.962.4.05:678.744.472:544.773.432

Первые результаты создания гибридного гидрогеля на основе фибрина и поливинилового спирта: сравнение с монокомпонентными гидрогелями

Е.А. Сенокосова, М.А. Резвова, В.В. Севостьянова, В.Г. Матвеева

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Аннотация

Фибрин крайне перспективен в тканевой инженерии. Однако он лишён необходимых физико-механических характеристик при создании материалов для нужд сердечно-сосудистой хирургии. Получение гибридного гидрогеля с взаимопроницающей сетью на основе фибрина и поливинилового спирта может улучшить свойства фибрина, в частности, повысить физико-механические характеристики и уменьшить склонность к усадке.

Цель – выполнить последовательную полимеризацию фибрина и поливинилового спирта для получения гибридного гидрогеля и изучить его свойства в сравнении с монокомпонентными гидрогелями.

Материал и методы. Из периферической крови пациентов методом этаноловой преципитации выделяли фибриноген, к нему добавляли поливиниловый спирт, растворенный в физиологическом растворе. Сначала инициировали полимеризацию фибрина, добавляя в раствор хлорид кальция. После следовал этап криоструктурирования поливинилового спирта циклами заморозки, разморозки и оттаивания. Таким образом, были приготовлены гибридные гидрогели на основе фибрина и поливинилового спирта и образцы из чистого фибрина и чистого поливинилового спирта. Изучали структуру гидрогелей, физико-механические свойства, усадку и биологическую активность. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 6.

Результаты. 3-D структура гибридного гидрогеля представлена сочетанием полигональных полостей поливинилового спирта, оплетенных сетью тонких фибриновых волокон. Распределение компонентов было равномерным в толще образцов, тогда как на поверхности преобладал поливиниловый спирт. Удлинение (247 (220,0; 293,2) %; $p = 0,0005$) и модуль Юнга (0,09 (0,11; 0,13) МПа; $p = 0,0001$) гибридного гидрогеля были статистически значимо выше относительно значений фибрина. Гибридный гидрогель не дал усадку, в отличие от фибрина, который усел в 11 раз. Количество адгезированных эндотелиальных клеток на матрицах из гибридного гидрогеля было в 8 раз выше, чем на поливинилово-м спирте, но в 10 раз меньше, чем на фибрине. Пролиферативная активность клеток на поливинилово-м спирте отсутствовала, на IPN-гидрогеле отмечено 13,6% пролиферирующих клеток, на фибрине 59,52%.

Заключение. Способ последовательной полимеризации IPN-гидрогеля фибрина и поливинилового спирта дает равномерное распределение волокон в толще материала и позволяет получать гидрогели с улучшенными механическими свойствами, отсутствием склонности к усадке. Но перераспределение компонентов на поверхности гибридного гидрогеля в пользу поливинилового спирта с поддержанием относительно низкой адгезионности материала диктует необходимость проведения дальнейших экспериментов по созданию оптимальных условий для жизнедеятельности клеток.

Ключевые слова:	фибрин, поливиниловый спирт, биоматериалы, биосовместимость, эндотелиальные клетки.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено в рамках фундаментальной темы Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».
Для цитирования:	Сенокосова Е.А., Резвова М.А., Севостьянова В.В., Матвеева В.Г. Первые результаты создания гибридного гидрогеля на основе фибрина и поливинилового спирта: сравнение с монокомпонентными гидрогелями. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):140–150. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-140-150 .

✉ Сенокосова Евгения Андреевна, e-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-140-150>
УДК 612.115:547.962.4.05:678.744.472:544.773.432

The first results of obtaining a hybrid hydrogel based on fibrin and polyvinyl alcohol: comparison with monocomponent hydrogels

Evgeniia A. Senokosova, Maria A. Rezvova, Viktoriia V. Sevostyanova,
Vera V. Matveeva

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Fibrin displays promising characteristics for tissue engineering. However, it has suboptimal physical and mechanical properties when used as a material for cardiovascular applications. Obtaining an interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel based on fibrin and polyvinyl alcohol (PVA) can improve the physical and mechanical characteristics and shrink behavior of fibrin.

Aim: To perform sequential polymerization of fibrin and PVA to obtain IPN hydrogel and analyze its properties in comparison with monocomponent hydrogels.

Material and Methods. Fibrinogen was isolated from the peripheral blood of patients using ethanol precipitation, then polyvinyl alcohol dissolved in saline was added to it. First, fibrin polymerization was initiated by adding calcium chloride to the solution. Then, it was followed by polyvinyl alcohol undergoing freeze–thaw cycles. Thus, a hydrogel based on fibrin and PVA, samples from pure fibrin and pure polyvinyl alcohol were prepared. We studied the structure of hydrogels, their physical and mechanical properties, shrink behavior and biological activity. Statistical data processing was carried out using the GraphPad Prism 6 software.

Results. 3D structure of the hydrogel is presented by polyvinyl alcohol polygonal cavities with a network of thin fibrin fibers. The distribution of components was equal in the inside of the samples, while polyvinyl alcohol prevails on the surface. Elongation (247 (220.0; 293.2)%; $p = 0.0005$) and Young's modulus (0.09 (0.11; 0.13) mPa; $p = 0.0001$) of the hydrogel were statistically significantly higher compared to fibrin values. The hydrogel did not shrink, unlike fibrin that shrunk (11-fold decrease in volume). The number of adherent endothelial cells on the hydrogel matrices was 8 times higher than on polyvinyl alcohol, but 10 times lower than on fibrin. There was no proliferative activity of cells on polyvinyl alcohol, but 13.6% of proliferating cells were noted on the IPN hydrogel, and 59.52% on fibrin

Conclusion. Using sequential polymerization to obtain the IPN hydrogel based on fibrin and polyvinyl alcohol provides an equal distribution of fibers in the thickness of the material, making it possible to obtain hydrogels with improved mechanical properties and shrink behavior. However, the components on the surface of the IPN hydrogel need to be redistributed - more polyvinyl alcohol should be added still maintaining a relatively low adhesiveness of the material. Therefore further research is necessary to create the most optimal conditions for cell activity.

Keywords:	fibrin, polyvinyl alcohol, biomaterials, biocompatibility, endothelial cells.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	this research was funded by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0419-2022-0001 "Molecular, cellular and biomechanical mechanisms of the pathogenesis of cardiovascular diseases in the development of new treatment methods based on personalized pharmacotherapy, minimally invasive medical devices, biomaterials and tissue-engineered implants".
For citation:	Senokosova E.A., Rezvova M.A., Sevostyanova V.V., Matveeva V.V. The first results of obtaining a hybrid hydrogel based on fibrin and polyvinyl alcohol: comparison with monocomponent hydrogels. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):140–150. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-140-150 .

Введение

Фибрин представляет собой природный полимер с уникальными для тканевой инженерии биологическими свойствами. Он является не только идеальным клеточным носителем с высокой способностью к удержанию клеток на поверхности [1–3], но, и благодаря способности связывать и дозированно высвобождать ростовые факторы, активно поддерживает ангиогенез и репарацию тканей [4, 5]. В отличие от других биополимеров (коллагены различных типов, фибронектин, эластин), аутологичный фибрин можно просто и в достаточном количестве получать из собственной крови пациента, что делает его весьма привлекательным материалом для персонализированной тканевой инженерии [6]. Однако низкие прочностные характеристики и склонность к усадке ограничивают его использование в конструкциях, подверженным значительным механическим нагрузкам и требующим сохранения формы, таких как протезы сосудов малого диаметра.

Одним из способов преодоления недостатков фибрина может стать создание гибридных гидрогелей с взаимопроникающей полимерной сетью (Interpenetrating polymer network, IPN-гидрогели). IPN-гидрогели дают возможность сочетать благоприятные свойства каждого из полимерных компонентов и имитировать структуру нативной ткани [7–9]. Гидрогели на основе поливинилового спирта (ПВС) обладают трехмерной структурой и достаточной механической прочностью, чтобы выступать в качестве надежных каркасов для замещения органов и тканей человека [10, 11]. Полимеризация ПВС методом криоструктурирования позволяет избежать использование токсичных и химически агрессивных соединений, что является несомненным преимуществом при создании тканеинженерных продуктов [12]. Однако отсутствие сайтов для адгезии клеток делает ПВС биоинертным материалом, неспособным к удержанию клеток на поверхности [13]. Внедрение в структуру ПВС белков, способных обеспечить клеточную адгезию, улучшит биологические характеристики материала. С другой стороны, введение в состав фибрина компонента, усиливающего каркасность и повышающего прочность, также может оказаться весьма полезным. Сочетание свойств фибрина и ПВС в структуре IPN-гидрогеля поможет преодолеть недостатки каждого из компонентов и получить улучшенный материал. Волокна фибрина поддержат клеточную жизнедеятельность, а сеть ПВС повысит прочность и снизит усадку IPN-гидрогеля.

Предлагаемая к разработке технология получения IPN-гидрогеля подразумевает равномерное перемешивание и последовательную полимеризацию сначала фибрина, а далее криоструктурирование ПВС. В результате должен сформироваться гидрогель с однородной структурой, представляющей собой переплетающиеся волокна фибрина и сети ПВС. В работе реализован подход, связанный с получением полностью аутологичного фибрина, без использования экзогенного тромбина [14].

Цель: выполнить последовательную полимеризацию фибрина и ПВС для получения IPN-гидрогеля и изучить его свойства.

Материал и методы

Для получения преципитата фибриногена использовали кровь, забранную с 3,8% цитратом натрия. Из плазмы выделяли преципитат методом этаноловой преци-

Introduction

Fibrin is a natural polymer with unique biological properties useful for tissue engineering. It is an ideal cell carrier with a high ability to retain cells on the surface [1–3], to bind and dosed release of growth factors for supports angiogenesis and tissue repair [4, 5]. Autologous fibrin can be obtained simply and in sufficient quantities from the patient's own blood, making it a very attractive material for personalized tissue engineering [6]. In contrast, sources of other autologous human biopolymers (such as collagen, fibronectin, elastin) have low availability. However, poor mechanical properties of fibrin and tendency to shrink limit its use in construction that carry significant mechanical loads and require shape retention, such as small-diameter vessel prostheses.

The formation of hybrid hydrogels with Interpenetrating polymer network (IPN-hydrogels) may be one of the ways to reduce fibrin disadvantages. IPN-hydrogels combine the favorable properties of each of the polymeric components and imitate the structure of native tissue [7–9]. Polyvinyl alcohol (PVA) hydrogels have a 3D structure and sufficient mechanical strength to act as reliable scaffolds for replacing human organs and tissues [10, 11]. PVA polymerization by cryostructuring makes it possible to avoid the use of toxic and chemically aggressive substances, which is an advantage in the creation of tissue engineering products [12]. However, the lack of sites for cell adhesion makes PVA a bioinert material with impossible retention cells on the surface [13]. The proteins incorporation into PVA structure will improve cell adhesion and biological characteristics of the material. On the other hand, the intercalation into fibrin of a component that enhances the frame properties and increases strength can also be very useful. Combining of fibrin and PVA in a single IPN hydrogel structure will help to obtain an improved material. Fibrin fibers will support cell activity, and the PVA network will increase mechanical strength and reduce shrinkage of the IPN hydrogel.

The proposed technology for the formation of an IPN hydrogel includes thorough mixing of the components and, sequential polymerization of fibrin first, then cryostructuring of PVA. As a result, hydrogel with a homogeneous structure, consisting of intertwining networks of fibrin and PVA, should be formed. The work uses the method of obtaining completely autologous fibrin, without the use of exogenous thrombin [14].

Aim

To perform sequential polymerization of fibrin and PVA to obtain an IPN hydrogel and study its properties.

Material and Methods

The study was approved by the Local Ethics Committee No. 4/1 dated April 18, 2022.

We used donor blood taken with 3.8% sodium citrate. The precipitate was isolated from plasma by ethanol precipitation with low ethanol concentration. The fibrinogen concentration in the precipitate was adjusted to 75 mg/ml.

PVA solution was prepared from a polymer with a molecular weight of 89–98 kDa, the degree of hydrolysis of acetate groups > 99% (Sigma-Aldrich, USA), which was

питации с низким содержанием этанола. Концентрацию фибриногена в преципитате доводили до 75 мг/мл.

Для получения раствора ПВС использовали полимер молекулярной массы 89–98 кДа, степенью гидролиза ацетатных групп > 99% (Sigma-Aldrich, США), который растворяли в NaCl 0,9% при температуре 90 °С до получения прозрачного раствора с концентрацией 75 мг/мл.

Приготовление образцов IPN-гидрогеля фибрина и ПВС

В преципитат фибриногена вносили ПВС в соотношении 1 : 1 и тщательно перемешивали. Для запуска полимеризации фибрина к раствору преципитата и ПВС добавляли CaCl₂ 0,4% в соотношении 1 : 4 и аprotинин. Готовую смесь заливали в форму и оставляли для полимеризации. Итоговая концентрация фибриногена и ПВС в образцах составила 30 мг/мл. Следующим этапом было криоструктурирование ПВС в образце. Для этого образцы охлаждали до –40 °С в течение суток, далее выполняли градиентную разморозку при –4 °С с экспозицией 8 ч и оттаивание при +6 °С. Циклы замораживания и оттаивания повторяли трижды.

Приготовление контрольных образцов фибрина

Концентрацию фибриногена в преципитате доводили до 60 мг/мл, далее вносили раствор CaCl₂ 0,2% в соотношении 1 : 1 и аprotинин, перемешивали, заливали в форму и оставляли для полимеризации. Итоговая концентрация фибриногена в фибрине 30 мг/мл.

Приготовление контрольных образцов ПВС

Раствор линейного ПВС готовили, как описано выше, доводили концентрацию в растворе до 30 мг/мл. Циклы замораживания и оттаивания контрольных образцов фибрина и ПВС выполняли вместе с образцами IPN-гидрогелей.

Изучение структуры гидрогелей

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Готовые образцы фиксировали в 1% растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение суток и отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (Gibco, США) и дистиллированной воде. После этого образцы замораживали и лиофилизировали в установке Freezezone 2.5 (Labconco, США) при температуре –40 °С и давлении < 0,133 мБар. Для визуализации внутренней структуры лиофилизированные образцы замораживали в жидком азоте и ломали. Методом ионного распыления на поверхность разлома наносили токопроводящее (Au/Pd) покрытие толщиной 7 нм. Структуру оценивали на микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Гистологическая окраска срезов гематоксилином и эозином

Для подготовки срезов образцы фиксировали в 10% забуференном формалине (BioVitrum, Россия) и в 2% глутаровом альдегиде, дегидратировали, пропитывали и заливали парафином ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия). Из полученных блоков с помощью микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США) изготавливали поперечные срезы толщиной 8 мкм которые депарафинизировали и дегидратировали. Окрашивание проводили раствором гематоксилина Гарриса (BioVitrum, Россия) 15 мин и далее раствором эозина (БиоВитрум, Россия) 30 сек. После промывания водой образцы дегидратировали в серии спиртов, просветляли

dissolved in NaCl 0.9% at a temperature of 90 °С to obtain a clear solution with a concentration of 75 mg / ml.

Sample preparation of IPN hydrogel fibrin and PVA

PVA was added to the fibrinogen precipitate as 1:1 and thoroughly mixed. To start the polymerization of fibrin, CaCl₂ 0.4% in a ratio of 1:4 and aprotinin were added to the precipitate and PVA solution. Immediately poured into a mold and left for polymerization. The final concentration of fibrinogen and PVA in the samples was 30 mg/ml. The next stage included cryostructuring of PVA in the sample. The samples were cooled to –40 °С during the day. Then gradient defrosting was performed at –4 °С with an exposure of 8 hours and thawing at +6 °С. Freeze-thaw cycles were repeated three times.

Preparation of fibrin control samples

The concentration of fibrinogen in the precipitate was adjusted to 60 mg/ml. Then a 0.2% solution of CaCl₂ was added in a ratio of 1:1 and aprotinin, mixed, poured into a mold, and left for polymerization. The final concentration of fibrinogen in fibrin is 30 mg/m

Preparation of PVA control samples

A solution of linear PVA was prepared as described above; the concentration in the solution was adjusted to 30 mg/mL. Freeze and thaw cycles of fibrin and PVA control samples were performed together with IPN hydrogel samples.

Studying the structure of hydrogels

Scanning electron microscopy (SEM)

The samples were fixed in 1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA) for 24 hours and washed in phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA) and then in distilled water. Next, the samples were frozen and lyophilized in a Freezezone 2.5 unit (Labconco, USA) at a temperature of –40 °С and a pressure of < 0.133 mBar. To visualize the internal structure, lyophilized samples were frozen in liquid nitrogen and broken. A conductive (Au/Pd) coating 7 nm thick was applied to the fracture surface by ion sputtering. The structure was evaluated using an S-3400N microscope (Hitachi, Japan) under high vacuum conditions at an accelerating voltage of 10 kV in the secondary electron mode.

Histological staining of sections with hematoxylin and eosin

Sections were fixed in 10% buffered formalin (BioVitrum, Russia) and 2% glutaraldehyde, then dehydrated, impregnated and embedded in GISTOMIX paraffi (BioVitrum, Russia). The paraffi blocks were cut into transverse slices 8 μm using an HM 325 microtome (Thermo Scientific, USA). Slices were deparaffinize and dehydrated, stained with Harris' hematoxylin solution (BioVitrum, Russia) for 15 minutes and then with eosin solution (BioVitrum, Russia) for 30 sec. Samples were washed with water and dehydrated in alcohol series, cleared by xylene and mounted in a mounting medium (BioVitrum, Russia) under a coverslip. Samples were visualized by AXIO Imager A1 microscope (Carl Zeiss, Germany).

в ксилоле и заключали в монтирующую среду (BioVitrum, Россия) под покровное стекло. Визуализацию проводили с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-спектроскопия)

Химическую структуру полученных гидрогелей характеризовали с помощью ИК-спектроскопии в диапазоне 400–4000 см⁻¹. Предварительно образцы лиофилизировали. Для IPN-гидрогелей после лиофилизации выполняли разлом в жидком азоте с последующим исследованием поверхности и толщи образцов.

Изучение механических свойств IPN-гидрогелей

Образцы готовили на вырубном прессе ZCP 020 (Zwick/Roell, Германия) с использованием ножа специальной формы. Механические свойства тестировали на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия) при температуре 37 °С с использованием датчика номинальной силы 50 Н. Предел прочности определяли по максимальному напряжению при растяжении (МПа), упруго-деформативные свойства – по относительному удлинению до начала разрушения (%), модуль Юнга (МПа) определяли в пределах малых деформаций. В качестве групп сравнения тестировали монокомпонентные гели на основе фибрина и ПВС.

Оценка усадки образцов

Образцы полимеризовали в 24-луночном планшете, отделяли от формы и измеряли радиус (r) и высоту (h) образцов гидрогелей (мм) ($n = 5$). Объем гидрогелей (V) рассчитывали по формуле: $V = \pi \times r^2 \times h$ (мм³).

Изучение биологических свойств

Тестирование биологических свойств гидрогелей проведено на культуре гибридомы эндотелиальных клеток пупочной вены человека EA hy 926. Для этого образцы гидрогелей в стерильных условиях заливали в лунки 24-луночного планшета ($n = 6$), формировали гидрогели как описано выше. Поверхность гидрогелей заселяли клетками по 20 тыс. клеток/лунку и культивировали 72 ч в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37,0 °С.

Оценка жизнеспособности клеток

Клетки окрашивали ядерными красителями Hoechst 33342 (10 мкг/мл, 14533, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) в течение 10 мин, и этидиум бромидом (30 мкг/мл, 46067, Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) в течение 1 мин. Подсчет мертвых клеток (ядра окрашены этидиум бромидом) и общего количества клеток (ядра окрашены Hoechst) на образцах и культуральном пластике производили на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) с 5 случайных полей зрения с каждого дубля.

Количество мертвых клеток (%) = Абсолютное количество мертвых клеток × 100% / Абсолютное количество всех адгезированных клеток. Относительное количество живых клеток определяли путем вычитания доли мертвых клеток из 100% адгезированных клеток.

Оценка пролиферативной активности клеток

Использовали набор Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (Thermo Fisher Scientific, USA). Клетки инкубировали с EdU-реагентом в течение 16 ч,

Fourier transform infrared spectroscopy (IR spectroscopy)

The chemical structure of hydrogels was characterized by IR spectroscopy in the range of 400–4000 cm⁻¹. Samples were lyophilized beforehand. After lyophilization, the IPN hydrogels were broken in liquid nitrogen; and the surface and thickness were examined.

Studying of mechanical properties of IPN hydrogels

Samples were prepared on a ZCP 020 punching press (Zwick/Roell, Germany) using a specially shaped knife. The mechanical properties were tested on a Z-series universal testing machine (Zwick/Roell, Germany) at a temperature of 37 °C using a 50 N nominal force probe. The tensile strength was determined by the maximum tensile stress (MPa), the elastic-deformation properties – by the relative elongation before the onset of failure (%), the Young's modulus (MPa) – within small deformations. Monocomponent gels of fibrin and PVA were tested as comparison groups.

Sample Shrinkage Assessment

The samples were polymerized in a 24-well plate, removed from the mold. And the radius (r) and height (h) of the hydrogel samples (mm) were measured ($n = 5$). The volume of hydrogels (V) was calculated by the formula: $V = \pi \times r^2 \times h$ (мм³).

The study of biological properties

The biological properties of hydrogels were tested on a culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cell hybridoma EA. hy926. Samples of hydrogels were poured under sterile conditions into the wells of a 24-well plate ($n = 6$). Hydrogels were formed as described above. The surface of the hydrogels was colonized with cells at 20 thousand cells/well and cultured for 72 hours in a CO₂ incubator at 5% CO₂ and a temperature of 37°C.

Cell viability assessment

Cells were stained with Hoechst 33342 nuclear stains (10 µg/mL, 14533, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) for 10 minutes followed by ethidium bromide (30 µg/mL, 46067, Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) within 1 minute. The calculation of dead cells (nuclei stained with ethidium bromide) and the total number of cells (nuclei stained with Hoechst) on samples and culture plastic was performed on an inverted microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) with 5 random fields of view from each take.

Relative number of dead cells (%) = Absolute number of dead cells × 100% / Absolute number of all adhered cells. The relative number of living cells was determined by subtracting the proportion of dead cells from 100% adherent cells.

Assessment of cell proliferative activity

We used the Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (Thermo Fisher Scientific, USA). Cells were incubated with the EdU reagent for 16 hours, and then stained according to the manufacturer's instructions. After the procedure, the cell nuclei were counterstained with DAPI 10 µg/ml (Sigma Aldrich, USA). The preparations were analyzed using a scanning confocal microscope

далее окрашивали в соответствии с инструкцией производителя. После окончания процедуры ядра клеток контрастировали DAPI 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, USA). Препараты анализировали с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM700 (Carl Zeiss, Germany), оценивали 10 случайно выбранных полей зрения для каждой группы ($n = 3$). Количественный анализ изображений осуществляли в программе ImageJ (National Institutes of Health, USA), подсчитывали общее количество клеток и количество пролиферирующих клеток в поле зрения. Относительное количество пролиферирующих клеток = количество пролиферирующих клеток в поле зрения \times 100 / общее количество клеток в поле зрения. Для определения количества адгезированных клеток выполнен пересчет клеток с поля зрения на 1 мм².

Статистическая обработка данных

Статистическую и графическую обработку результатов выполняли в программе Prism 6. Нормальность распределения количественных показателей проверяли по критерию Колмогорова – Смирнова. Количественные данные представлены в виде медианы и 1-го и 3-го квартиля ($Me (Q_1; Q_3)$). Достоверность различий между группами оценивали с помощью критерия Краскела – Уоллиса с поправкой результатов с учетом множественности сравнения методом FDR. Статистическая значимость определена как $p < 0,05$ во всех тестах.

Результаты

Структура гидрогелей

На фотографиях со СЭМ видны различия в 3D-структуре образцов (рис 1А). Фибрин представлен сетью тонких переплетающихся волокон, ПВС состоит из трубчатых и полигональных полостей, разделенных тонкими стенками, в которых имеются поры. IPN-гидрогель фибрина и ПВС включает оба элемента: стенки и трубчатые структуры покрыты сетью переплетающихся волокон (рис. 1). Однако данный метод не позволяет достоверно отличать структуры, относящиеся к различным источникам (фибрин или ПВС).

Хорошее визуальное разделение 2D структур фибрина и ПВС дает гистологическая окраска гематоксилином и эозином. При этом фибрин окрашивается в ярко красный цвет, ПВС в нежно-сиреневый (рис. 1В). Толща IPN-гидрогеля состоит из равномерно распределенных волокон фибрина и полостей ПВС. Гистологические результаты подтверждают данные СЭМ и свидетельствуют о том, что данный способ позволяет выполнять последовательную полимеризацию с равномерным распределением компонентов в толще IPN-гидрогеля. Однако визуализация края IPN-гидрогеля показывает, что на поверхности и непосредственно вблизи краевой зоны превалирует ПВС (рис. 1С).

Результаты ИК спектроскопии (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR)

FTIR спектр фибрина содержит полосы, типичные для амидной связи белковой структуры, а именно: 1635 см⁻¹ (амид I, обусловлена растяжением связи C-H карбонильной группы), 1550 см⁻¹ (амид II, обусловлена деформационными колебаниями связи N-H и растяжением связи C-N) [15, 16]. Характерные пики поглощения валентных колебаний связи O-H от меж- и внутримолекулярных во-

LSM700 (Carl Zeiss, Germany). 10 randomly selected visual fields were evaluated for each group ($n = 3$). Quantitative analysis of images was carried out using the ImageJ program (National Institutes of Health, USA), the total number of cells and the number of proliferating cells in the field of view were counted.

Relative number of proliferating cells = number of proliferating cells in the visual field \times 100 / total number of cells in the visual field. To determine the number of adherent cells, they were recalculated from the field of view per 1 mm².

Statistics

Statistical and graphical processing of the results was performed using the Prism 6 program. The normality of the data distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Quantitative data are presented as median and 1st and 3rd quartiles ($Me (Q_1; Q_3)$). Comparison between groups was carried out by Kruskal –Wallis test with correction of the results taking into account the multiplicity of comparisons by the FDR method. Statistical significance is defined as $p < 0.05$ in all tests.

Results

3D and 2D structure of hydrogels

The SEM images show differences in the 3D structure of the samples (Fig. 1A). Fibrin is represented by a network of thin intertwining fibers; PVA consists of tubular and polygonal cavities separated by thin walls with pores. The IPN hydrogel fibrin/P A includes both elements: walls and tubular structures are covered with a network of intertwining fibers (Fig. 1). However, this method does not allow distinguishing structures belonging to different sources (fibrin or P A).

Good visual separation of the 2D structures of fibrin and PVA is obtained by histological staining with hematoxylin and eosin. Wherein, fibrin colored in red; and PVA colored in soft purple (Fig. 1B, 1C). IPN hydrogel inside consists of evenly distributed fibrin fibers and PVA cavities (Fig. 1B). The histological results confirm the SEM images and indicate that this method allows sequential polymerization with a homogeneous distribution of components throughout the IPN hydrogel (Fig. 1B). However, visualization of IPN hydrogel edge shows the predominance of PVA on the surface and immediately near the edge zone (Fig. 1C).

IR spectroscopy (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR)

The FTIR spectrum of fibrin contains bands typical of the amide bond of the protein structure, namely: 1635 cm⁻¹ (amide I, due to the stretching of the C-H bond of the carbonyl group), 1550 cm⁻¹ (amide II, due to bending vibrations of the N-H bond and stretching of the C-N bond) [15, 16] (Fig. 2).

Characteristic absorption peaks of stretching vibrations of the O–H bond from inter- and intramolecular hydrogen bonds are noted at 3300 cm⁻¹ in the spectra of PVA, the bands are also duplicated in the spectra of

дородных связей отмечены при 3300 см^{-1} в спектрах ПВС, полосы дублируются и в спектрах IPN-композитной структуры. Также в обоих спектрах (ПВС и IPN-гидрогелей) обнаружены полосы валентных колебаний C–H алкильных групп в области $2930\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ и растяжения C–O-связи гидроксильной группы при 1085 см^{-1} [17, 18] (рис. 2).

По сравнению с чистым ПВС в спектрах IPN-гидрогеля наблюдали рост интенсивности полос в области, соответствующей амидной связи, что обусловлено присутствием фибрина в составе композитного материала. Отмечены различия в спектрах IPN гидрогеля с поверхности и толщи образца (разлома), которые демонстрируют присутствие большего количества фибрина в толще по сравнению с поверхностью. Эти данные подтверждают результаты гистологического исследования.

Биологические свойства образцов

Медиана количества адгезированных клеток на матрицах из IPN-гидрогеля примерно в 8 раз выше, чем для ПВС, но в 10 раз меньше, чем на фибрине. Пролиферативная активность клеток на ПВС отсутствовала, на IPN-гидрогеле отмечено 13,6% пролиферирующих клеток, максимальные показатели зарегистрированы на фибрине (рис. 3). При этом жизнеспособность прикрепленных клеток была высокой и не различалась в группах (таблица 1).

Таблица 1. Клеточная адгезия и жизнеспособность

Параметры	Фибрин	ПВС	Фибрин-ПВС-гидрогель
Кол-во клеток, мм ²	294,90 (247,9; 332,6)	3,13 * (0,00; 11,69)	25,10 *# (15,69; 38,52)
Пролиферативная активность, %	59,52 (54,62; 67,69)	0,00 * (0,00; 0,00)	13,63 *# (0,00; 33,33)
Жизнеспособность, %	100,00 (100,00; 100,00)	100,00 (81,25; 100,00)	100,00 (100,00; 100,00)

Примечания: * – $p < 0.05$ по сравнению с фибрином, # – $p < 0.05$ по сравнению с ПВС.

the IPN-composite structure (Fig. 2). Also, in both spectra (PVA and IPN hydrogels), bands of C–H stretching vibrations of alkyl groups in the region of $2930\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ and stretching of the C–O bond of the hydroxyl group at 1085 см^{-1} were found [17, 18]. There was an increase of bands intensity in the amide spectra of IPN-hydrogel region, compared with pure PVA, which is due to fibrin in the composite material. Spectral differences of the surface and the inside (fault) of IPN hydrogel were noted. Greater amount of fibrin inside compared to the surface was demonstrated. These data confirm the results of histological examination.

Biological properties of samples

The median number of adherent cells on IPN hydrogel matrices was about 8 times higher than for PVA, but 10 times less than on fibrin (Table). There was no proliferative activity of cells on PVA. 13.6% of proliferating cells were noted on IPN hydrogel. The maximum values were registered on fibrin (Fig. 3). At the same time, the viability of attached cells was high and did not differ in groups.

Table. Cell adhesion and viability

Options	Fibrin	PVA	IPN Fibrin/PVA
Number of cells, mm ²	294,90 (247,9; 332,6)	3,13 * (0,00; 11,69)	25,10 *# (15,69; 38,52)
Proliferative activity, %	59,52 (54,62; 67,69)	0,00 * (0,00; 0,00)	13,63 *# (0,00; 33,33)
Viability, %	100,00 (100,00; 100,00)	100,00 (81,25; 100,00)	100,00 (100,00; 100,00)

Note: * – $p < 0.05$ compared to fibrin, # – $p < 0.05$ compared to PVA.

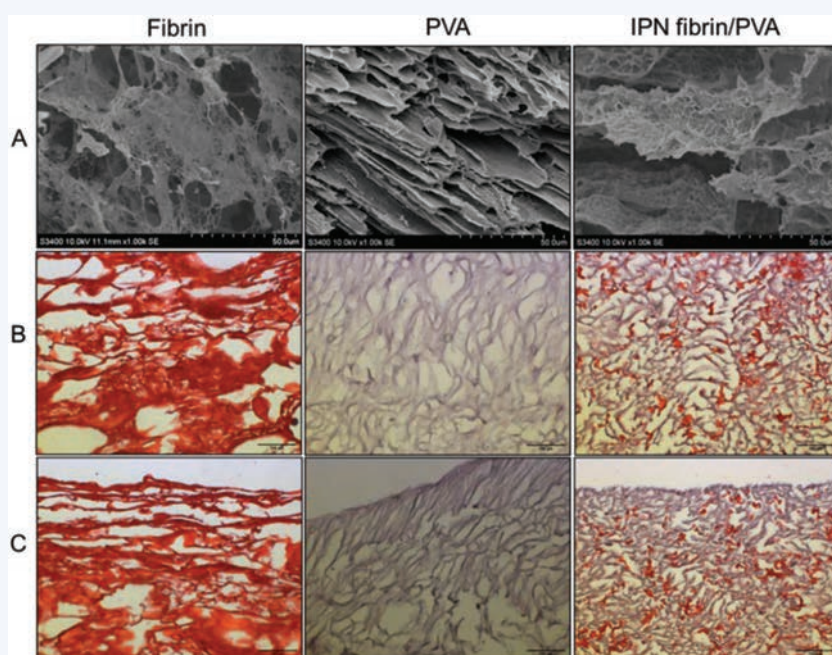


Рис. 1. Структура гидрогелей. А. СЭМ. Линейка = 50 μm.; В, С. Световая микроскопия. В – толща гидрогелей; С – край гидрогелей. Линейка = 100 μm
Fig. 1. The structure of hydrogels. A. SEM (magnification × 1000); B, C. Light microscopy. B – inside of hydrogels; C – edge of hydrogels. Scale bar = 100 μm

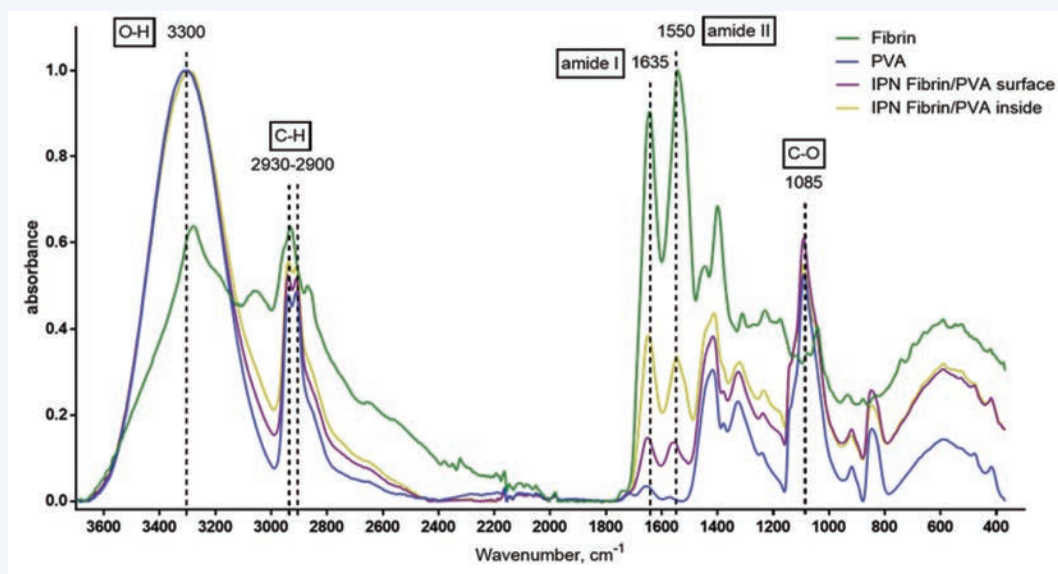


Рис. 2. Спектры поглощения ИК-спектроскопии для фибрина, ПВС, Фибрин-ПВС-гидрогеля с поверхности и толщи
Fig. 2. IR absorption spectra for fibrin, PVA, IPN Fibrin/PVA hydrogel from surface and inside

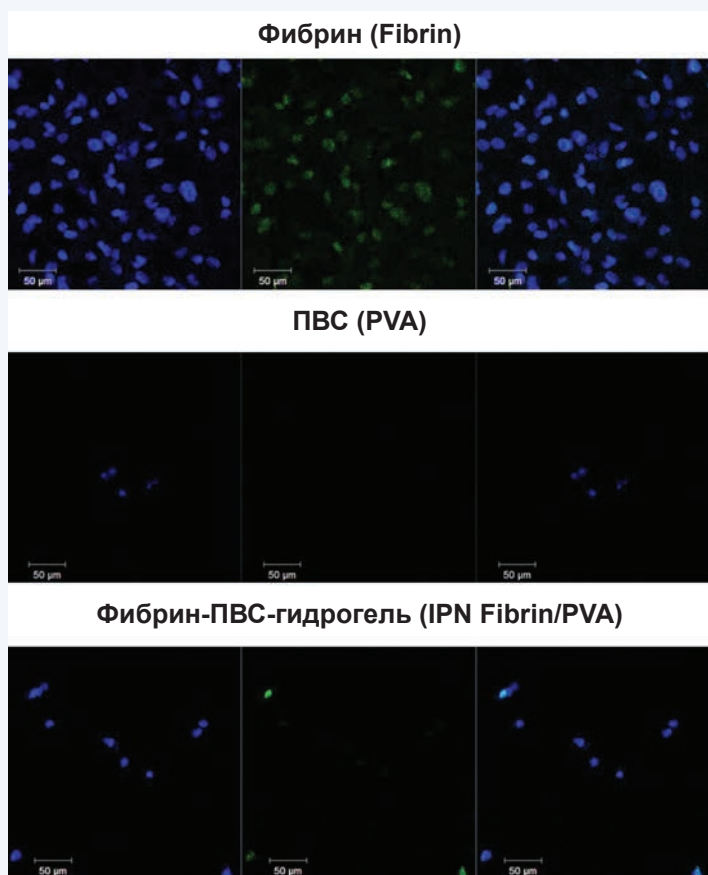


Рис. 3. Конфокальная микроскопия пролиферирующих клеток на гидрогелях. Синее свечение – ядра всех адгезированных клеток, зеленое свечение – ядра пролиферирующих клеток. Линейка = 50 μm.

Fig.3. Confocal microscopy of proliferating cells on hydrogels. Blue, nuclei of all adherent cells, green, nuclei of proliferating cells. Scale bar = 50 μm

Усадка матриц

Объем шаблона для заливки гидрогелей составил 2318,3 (2254,8; 2365,8) мм³. Фибрин после трехкратного замораживания и оттаивания дал значительную усадку и его объем уменьшился до 204,3 (199,5; 216,4) мм³ (рис. 4). IPN-гидрогель и полимеризованный ПВС практически не

Matrix shrinkage

The volume of the template for pouring hydrogels was 2318.3 (2254.8; 2365.8) mm³. Fibrin after three times freezing and thawing showed a significant shrinkage and its volume decreased to 204.3 (199.5; 216.4) mm³ (Fig 4). IPN hydrogel and polymerized PVA practically did not

подверглись усадке, их объем составил 1683,1 (1640,7; 1789,3) мм³ и 1701 (1643,6; 1763,5) мм³ соответственно.

Механические характеристики гидрогелей

Прочность и удлинение до разрушения образцов IPN-гидрогеля была выше по сравнению с фибрином и ниже, чем ПВС (рис 5). Медианы модуля Юнга (упругости) у IPN-гидрогелей и ПВС не различались между собой, при этом были значительно выше, чем у фибрина.

shrink; their volume was 1683.1 (1640.7; 1789.3) mm³ and 1701 (1643.6; 1763.5) mm³, respectively.

Mechanical characteristics of hydrogels

The strength and elongation at break of the IPN hydrogel samples were higher compared to fibrin and lower than PVA (Fig. 5). The medians Young's modules (elasticity) of IPN hydrogels and PVA did not differ from each other, while they were significantly higher than those of fibrin.

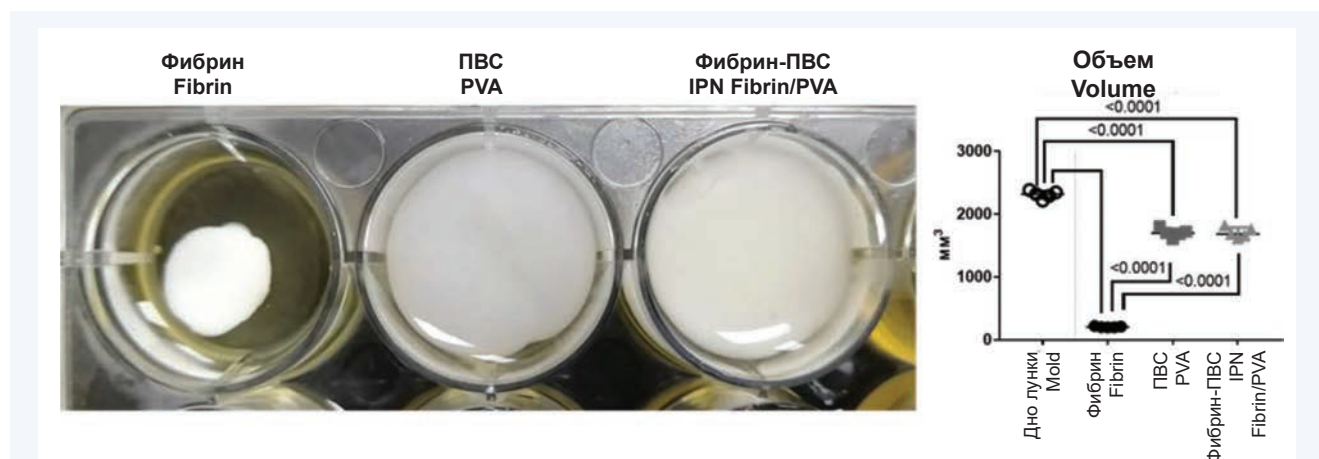


Рис. 4. Внешний вид образцов гидрогелей фибрина, ПВС и Фибрин-ПВС-гидрогеля
Fig. 4. View of fibrin, PVA and IPN hydrogel samples of fibrin and PVA

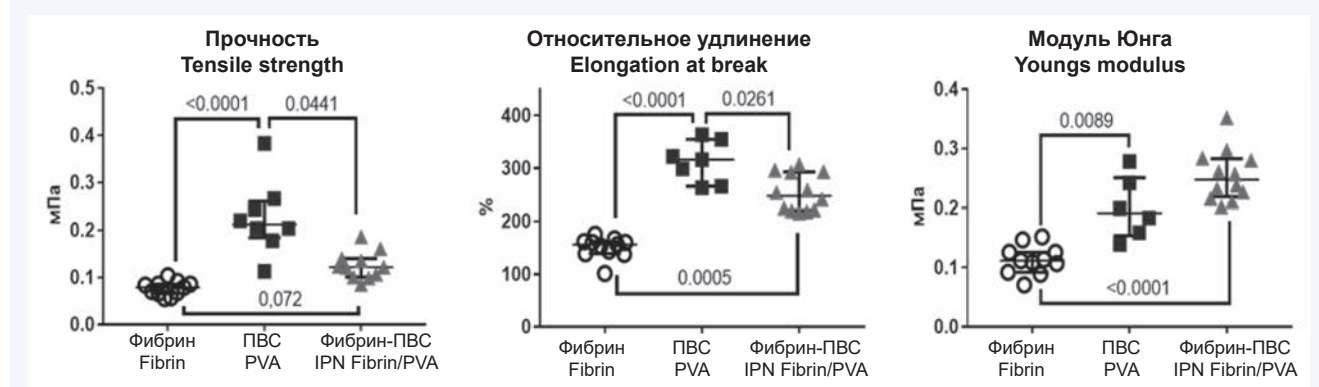


Рис. 5. Механические свойства образцов
Fig. 5. Mechanical properties of hydrogels

Обсуждение

Мы изучили наиболее важные свойства гибридного IPN-гидрогеля фибрина и ПВС и сравнили со свойствами монокомпонентных контрольных образцов. Визуализация структуры IPN-гидрогелей подтвердила, что предложенный метод позволяет проводить последовательную полимеризацию фибрина и далее ПВС. В результате формируется IPN-гидрогель, состоящий из сети волокон фибрина, покрывающих полостные структуры ПВС. При этом в толще распределение компонентов можно считать равномерным, но на поверхности преобладают структуры ПВС.

Несмотря на улучшение показателей биосовместимости IPN-гидрогеля по сравнению с ПВС, мы не получили ожидаемого высокого роста биологической активности

Discussion

We studied the most important properties of the IPN hydrogel fibrin/PVA and compared with those of monocomponent controls. IPN hydrogels structure confirmed that the proposed method allows sequential polymerization of fibrin and then PVA. As a result, IPN hydrogel is formed by fibrin network and fibrin fibers covering the PVA cavity structures. In this case, the distribution of components inside the IPN hydrogel can be considered homogeneous, but the surface mainly includes PVA.

Despite the improvement in the biocompatibility of the IPN hydrogel compared to PVA, we did not obtain the expected high increase in the biological activity of the IPN hydrogel. That may be due to the peculiarities

IPN-гидрогеля, что может быть связано с особенностями перераспределения компонентов на поверхности матриц в пользу ПВС. ПВС известен своей гидрофильной природой, к тому же не содержит сайты для адгезии клеток, что затрудняет адгезию и удержание клеток [19, 20]. Тем не менее, присутствие относительно небольшого количества фибрина на поверхности IPN-гидрогеля позволило создать условия для адгезии (количество клеток) и жизнедеятельности (пролиферативной активности) клеток, но показатели были существенно ниже, чем на фибрине. При этом ПВС и IPN-гидрогель не обладали цитотоксичностью, об этом свидетельствует высокая жизнеспособность адгезированных клеток.

Одним из существенных недостатков фибрина является выраженная склонность к усадке образцов после отделения от формы (рис. 4). Введение ПВС в структуру фибрина в форме IPN-гидрогеля позволило сформировать резистентный к усадке каркас, что облегчает использование материала для создания конструкций определенной формы в тканевой инженерии. Как ожидалось, введение ПВС в состав фибрина и создание IPN-гидрогеля улучшило прочность, эластичность и упругость материала.

Заключение

Способ последовательной полимеризации IPN-гидрогеля фибрина и ПВС дает равномерное распределение волокон в толще материала и позволяет получать гидрогели с улучшенными механическими свойствами, отсутствием склонности к усадке. Однако перераспределение компонентов на поверхности IPN-гидрогеля в пользу ПВС с поддержанием относительно низкой адгезионности материала, диктует необходимость проведения дальнейших экспериментов по созданию оптимальных условий для жизнедеятельности клеток.

Литература / References

- Chlupáč J., Filová E., Riedel T., Houska M., Brynda E., Remy-Zolghadri M. et al. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol. Res.* 2014;63(2):167–177. DOI: 10.33549/physiolres.932577.
- Filová E., Brynda E., Riedel T., Chlupáč J., Vandrovcová M., Svindrych Z. et al. Improved adhesion and differentiation of endothelial cells on surface-attached fibrin structures containing extracellular matrix proteins. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2014;102(3):698–712. DOI: 10.1002/jbm.a.34733.
- Marinero F., Silva J.M., Barros A.A., Aroso I.M., Gómez-Blanco J.C., Jardim I. et al. A fibrin coating method of polypropylene meshes enables the adhesion of menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells: a new delivery strategy for stem cell-based therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13385. DOI: 10.3390/ijms222413385.
- Morin K.T., Tranquillo R.T. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp. Cell Res.* 2013;319(16):2409–2417. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.06.006.
- Certelli A., Valente P., Uccelli A., Grosso A., Di Maggio N., D'Amico R et al. Robust angiogenesis and arteriogenesis in the skin of diabetic mice by transient delivery of engineered VEGF and PDGF-BB proteins in fibrin hydrogels. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:688467. DOI: 10.3389/fbioe.2021.688467.
- Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Глушкова Т.В., Матвеева В.Г. Создание персонализированного клеточнозаселенного сосудистого протеза *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(2S):89–93. [Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Glushkova T.V., Matveeva V.G. Development of personalized cell-populated vascular graft *in vitro*. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(2S):89–93. (In Russ.)]. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93.
- Utracki L.A., Wilkie C.A. (editors). *Polymer Blends Handbook*. New

of the redistribution of components on the surface of the matrices in favor of PVA. PVA for its hydrophilic nature rendering thus difficult to support cell adhesion and spreading [19, 20].

Nevertheless, a relatively small amount of fibrin on the surface of the IPN hydrogel made it possible to create conditions for adhesion (number of cells) and vital activity (proliferative activity) of cells, but the indicators were significantly lower than on fibrin. At the same time, PVA and IPN hydrogel did not possess cytotoxicity, which is evidenced by the high viability of adherent cells.

One of the significant disadvantages of fibrin is a pronounced tendency for samples to shrink after separation from the mold (Fig. 4). The introduction of PVA into the fibrin structure in the form of an IPN hydrogel made it possible to form a shrink-resistant scaffold, which facilitates the use of the material to create structures of a certain shape in tissue engineering. As expected, the introduction of PVA into the composition of fibrin and the creation of an IPN hydrogel improved the strength, elasticity, and resilience of the material.

Conclusion

The method of successive polymerization of IPN hydrogel fibrin/PVA gives an equal distribution of fibers in the thickness of the material and makes it possible to obtain hydrogels with improved mechanical properties and no tendency to shrink. However, the redistribution of components on the surface of the IPN hydrogel in favor of PVA while maintaining a relatively low adhesiveness of the material dictates the need for further experiments to create optimal conditions for cell activity.

- York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer Reference; 2002. DOI: 10.1007/978-94-007-6064-6.
- Slaughter B.V., Khurshid S.S., Fisher O.Z., Khademhosseini A., Pappas N.A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.* 2009;21(32–33):3307–3329. DOI: 10.1002/adma.200802106.
 - Dhand A.P., Galarraga J.H., Burdick J.A. Enhancing biopolymer hydrogel functionality through interpenetrating networks. *Trends Biotechnol.* 2021;39(5):519–538. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.08.007.
 - Kumar A., Han S.S. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2017;66(4):159–182. DOI: 10.1080/00914037.2016.1190930.
 - Weller W.J. Emerging technologies in upper extremity surgery: polyvinyl alcohol hydrogel implant for thumb carpometacarpal arthroplasty and processed nerve allograft and nerve conduit for digital nerve repairs. *Orthop. Clin. North. Am.* 2019;50(1):87–93. DOI: 10.1016/j.ocl.2018.08.011.
 - Deshmukh K., Ahamed M.B., Deshmukh R., Pasha S.K., Bhagat P., Chidambaram K. Biopolymer composites with high dielectric performance: Interface engineering. *Biopolymer Composites in Electronics.* 2017:27–128. DOI: 10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6.
 - Gupta S.T.G., Basu B., Goswami S., Sinha A. Stiffness- and wettability-dependent myoblast cell compatibility of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2013;101B:346–354. DOI: 10.1002/jbm.b.32845.
 - Способ изготовления аутологичного фибрина с регулируемым содержанием фибриногена без использования экзогенного тромбина. Патент RU 2758260 C1. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Дата регистрации: 27.10.2021. [Method for manufacturing autologous fibrin with controlled fibrinogen content without using exogenous thrombin. Patent RU 2758260 C1. Antonova L.V., Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Date of registration: 27.10.2021. (In Russ.)]. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=47122803> (09.01.2023).

15. Brown E.E., Zhang J., Laborie M.P.G. Never-dried bacterial cellulose/fibrin composites: preparation, morphology and mechanical properties. *Cellulose*. 2011;18:631–641. DOI: 10.1007/s10570-011-9500-8.
16. Blat A., Dybas J., Chrabaszcz K., Bulat K., Jaształ A., Kaczmarek M. et al. FTIR, Raman and AFM characterization of the clinically valid biochemical parameters of the thrombi in acute ischemic stroke. *Scientific reports*. 2019;9(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-51932-0.
17. Choo K., Ching Y., Chuah C., Julai S., Liou N.S. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. *Materials*. 2016;9(8):644. DOI: 10.3390/ma9080644.
18. Sa'adon S., Ansari M.N.M., Razak S.I.A., Anand J.S., Nayan N.H.M., Ismail A.E. et al. Preparation and physicochemical characterization of a diclofenac sodium-dual layer polyvinyl alcohol patch. *Polymers*. 2021;13:2459. DOI: 10.3390/polym13152459.
19. Ino J.M., Chevallier P., Letourneur D., Mantovani D., Le Visage C. Plasma functionalization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for cell adhesion enhancement. *Biomatter*. 2013;3(4):e25414. DOI: 10.4161/biom.25414.
20. Qiu K., Netravali A.N. A composting study of membrane-like polyvinyl alcohol based resins and nanocomposites. *J. Polym. Environ.* 2013;21:658–674. DOI: 10.1007/s10924-013-0584-0.

Информация о вкладе авторов

Сенокосова Е.А., Матвеева В.Г. и Резвова М.А. предложили концепцию исследования и разработали его протокол, отработали метод и изготовили образцы гидрогелей, провели все необходимые виды исследований.

Севостьянова В.В. провела статистический анализ полученных результатов.

Сенокосова Е.А., Матвеева В.Г. и Резвова М.А. анализировали и интерпретировали данные.

Сенокосова Е.А., Матвеева В.Г. и Резвова М.А. написали первую версию рукописи.

Севостьянова В.В. перевела статью на английский язык.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ручаясь за их точность и безупречность.

Сведения об авторах

Сенокосова Евгения Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-9430-937X.

E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

Резвова Мария Александровна, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4405-8904.

E-mail: rezvovama@gmail.com.

Севостьянова Виктория Владимировна, канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0003-0195-8803.

E-mail: sevastv@gmail.com.

Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4146-3373.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

 **Сенокосова Евгения Андреевна**, e-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

Information on author contributions

Senokosova E.A., Matveeva V.G., Rezvova M.A. proposed the concept of the study and developed its protocol, worked out the method and made samples of hydrogels, conducted all the necessary types of research, analyzed and interpreted the data, wrote the first version of the manuscript.

Sevostyanova V.V. carried out a statistical analysis of the obtained results, translated the article into English.

All authors gave their final consent to the submission of the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of the work, vouching for their accuracy and flawlessness.

Information about the authors

Evgenia A. Senokosova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-9430-937X.

E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

Maria A. Rezvova, Junior Research Scientist, Laboratory for Novel Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-4405-8904.

E-mail: rezvovama@gmail.com.

Viktoriya V. Sevostyanova, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0003-0195-8803.

E-mail: sevastv@gmail.com.

Vera G. Matveeva, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Laboratory of Cell Technologies. Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-4146-3373.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

 **Evgenia A. Senokosova**, e-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

Received November 10, 2022

Поступила 10.11.2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-151-159>
УДК 616.1-77-089.844:544.777:547.995.17:577.11]-092.9

Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ

Е.О. Кривкина, А.В. Миронов, А.Р. Шабает, Е.А. Великанова, М.Ю. Ханова, А.В. Синицкая, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Аннотация

Тканеинженерные сосудистые протезы, разрабатываемые для протезирования артерий малого диаметра, помимо высокой биосовместимости и сохранения своей проходимости после имплантации в сосудистое русло, должны также обладать пригодностью для формирования на своей основе новообразованной ткани, максимально соответствующей нативной сосудистой ткани.

Цель: оценка результатов долгосрочной проходимости биodeградируемых сосудистых протезов с атромбогенным лекарственным покрытием на модели крупных лабораторных животных.

Материал и методы. Сосудистые протезы диаметром 4 мм были изготовлены методом электроспиннинга из полимерной композиции 5% полигидросибутирата/валериата (PHBV) и 10% поликапролактона (PCL) и комплекса проангиогенных факторов (GFmix): сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантной молекулы (SDF-1 α). Для повышения тромборезистентных свойств графтов была проведена атромбогенная модификация поверхности части изготовленных протезов гепарином и илопростом. Модифицированные протезы были имплантированы в сонную артерию овец сроком на 12 мес. Группа с аутоартериальной имплантацией выступила в качестве контроля.

Результаты. Спустя 12 мес. имплантации проходимость аутоартериальных трансплантатов составила 87,5%. Проходимость PHBV/PCL/GFmix с гепарином и илопростом по окончании срока имплантации достигла 50%. Биodeградируемый каркас модифицированных протезов практически полностью резорбировался с образованием аневризм на всем протяжении. В модифицированных протезах обнаружено наличие основных элементов новообразованной сосудистой ткани и отмечено отсутствие кальция в стенках протезов.

Заключение. Полученные результаты показали, что биodeградируемые сосудистые протезы PHBV/PCL/GFmix^{Нер/Ило} обладают высокой долгосрочной проходимостью, что позволяет считать их пригодными для формирования на их основе новообразованной сосудистой ткани. Однако в связи с наличием факта аневризмообразования требуется проведение дополнительного укрепления каркаса протеза и повышения атромбогенных свойств внутренней поверхности.

Ключевые слова:	сосудистые протезы, гемосовместимость, электроспиннинг, гепарин, илопрост, проангиогенные факторы.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации № 075-15-2022-1202 от 30 сентября 2022 г., заключенного в целях реализации Распоряжения Правительства Российской Федерации от 11 мая 2022 г. № 1144-р.
Для цитирования:	Кривкина Е.О., Миронов А.В., Шабает А.Р., Великанова Е.А., Ханова М.Ю., Синицкая А.В., Антонова Л.В., Барбараш Л.С. Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):152–159. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-152-159 .

Кривкина Евгения Олеговна, e-mail: leonora92@mail.ru.

Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis

Evgeniya O. Krivkina, Andrey V. Mironov, Amin R. Shabaev,
Elena A. Velikanova, Mariam Yu. Khanova, Anna V. Sinitskaya,
Larisa V. Antonova, Leonid S. Barbarash

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”,
6, Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Tissue-engineered vascular prostheses developed for prosthesis of small-diameter arteries have high biocompatibility and coverage of their patency after implantation into the vascular bed, and should also show a high probability of forming on their basis a newly formed tissue that is largely susceptible to native vascular tissue.

Aim: To evaluate the expected patency of biodegradable vascular prostheses with athrombogenic drug coating in large laboratory animal models.

Material and Methods. Vascular prostheses Ø 4 mm were fabricated by electrospinning from a polymer composition of 5% polyhydroxybutyrate/valerate (PHBV) and 10% polycaprolactone (PCL) and a complex of proangiogenic tissues (GFmix): vascular endothelial growth (VEGF), rare fibroblast growth (bFGF) and chemoattractant molecule (SDF-1 α). To induce thromboresistant properties of grafts, an athrombogenic modification of the surface of parts of the fabricated prostheses with heparin and iloprost was carried out. Modified prostheses were implanted in the carotid artery for a period of 12 months. The group with autoarterial implantation acted as a control.

Results. In 12 months after implantation, the patency of auto-arterial grafts was 87.5%. The patency of PHBV/PCL/GFmix with heparin and iloprost reached 50% at the time of implantation. The biodegradable frame made of reinforced prostheses was almost completely resorbed with the formation of aneurysms throughout. In the modified prostheses, the main elements of the newly formed vascular tissue are present. There is no formation in the walls of the prostheses.

Conclusion. The results showed that biodegradable vascular prostheses PHBV/PCL/GFmix^{hep/ilo} have a high final patency, which allows us to consider them suitable for the formation of newly formed vascular tissue on their basis. However, due to the aneurysm formation, a long-term execution of the bone tissue of the prosthesis and the thrombogenic properties of the inner surface are required.

Keywords:	vascular prostheses, hemocompatibility, electrospinning, heparin, iloprost, pro-angiogenic factors.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Agreement on the provision of grants from the federal budget in the form of subsidies in accordance with paragraph 4 of Article 78.1 of the Budget Code of the Russian Federation №075-15-2022-1202 dated September 30, 2022, concluded to implement the Order of the Russian Federation Government dated May 11, 2022 No. 1144-r.
For citation:	Krivkina E.O., Mironov A.V., Shabaev A.R., Velikanova E.A., Khanova M.Yu., Sinitskaya A.V., Antonova L.V., Barbarash L.S. Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):151–159. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-151-159 .

Введение

В связи с постоянным ростом частоты развития атеросклероза во всем мире возрастает также и количество хирургических вмешательств по восстановлению эффективного кровотока в поврежденных кровеносных сосудах посредством их протезирования или наложения шунтов [1]. Нехватка аутологичных кровеносных сосудов ведет к поиску альтернатив для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Сосудистая тканевая инженерия является перспективным направлением для создания новых эффективных сосудистых протезов [2–4]. Все подходы сосудистой тканевой инженерии направлены на создание высокопористого сосудистого протеза, обеспечивающего формирование ткани, идентичной нативным кровеносным сосудам человека. Высокая пористость стенки протеза и является важной характеристикой сосудистого протеза, обеспечивающей свободную миграцию клеток из кровотока и окру-

жающих тканей, а также поддерживающей прикреплению, пролиферацию и дифференцировку клеток в сосудистом направлении. Проангиогенные факторы и хемоаттрактантные молекулы, инкорпорированные в состав протеза в процессе его изготовления, способны стимулировать формирование полноценной новообразованной сосудистой ткани на месте имплантации сосудистого протеза [5]. Однако протез с такой конструкцией может вызвать тромбоз, поэтому для предотвращения тромбообразования поверхность тканеинженерного высокопористого сосудистого протеза можно модифицировать антитромботическими и антибактериальными препаратами [6].

Модифицирование тканеинженерных протезов проангиогенными факторами и дополнительная модификация их поверхности лекарственными препаратами с антиагрегантной и антикоагулянтной активностью позволяет повысить долгосрочную проходимость и качество ремоделирования [5, 6]. Таким образом, альтернативой сосудистого аналога артерий и вен малого диаметра может стать функционально активный биodeградируемый сосудистый протез, обладающий пролонгированной резорбцией и способный замещаться во времени собственными клетками и тканями пациента, формируя на месте каркаса новый сосуд [7–10].

Материал и методы

Изготовление тканеинженерных сосудистых протезов

Тканеинженерные сосудистые каркасы диаметром 4 мм изготавливали методом двухфазного электроспиннинга на аппарате Nanon-01A (MECC, Япония) из композиции полимеров 5% поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV; Sigma-Aldrich, США) и 10% поли(ε-капролактона) (poly-ε-caprolactone; PCL; Sigma-Aldrich, США) в хлороформе, с включением в состав биологически активных молекул (GFmix), а именно: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF; Sigma-Aldrich, США) включенный в 1/3 внутренней стенки протеза, основной фактор роста фибробластов (bFGF; Sigma-Aldrich, США) и хемоаттрактантная молекула (SDF-1α; Sigma-Aldrich, США) – во внешние 2/3 стенки протеза.

Модификация поверхности сосудистых протезов антикоагулянтами и антиагрегантами

Для увеличения тромборезистентности поверхности изготовленных сосудистых протезов была проведена дополнительная поверхностная антитромботическая модификация по собственной оригинальной методике [11]. В качестве антитромботических лекарственных средств использовались антиагрегант илопрост (Ilo) и антикоагулянт нефракционированный гепарин (Hep).

На внутренней поверхности изготовленных полимерных каркасов методом радиационной прививочной полимеризации создавалось гидрогелевое покрытие из поливинилпирролидона (polyvinylpyrrolidone, PVP) для связывания лекарственных средств посредством комплексообразования. Для этого протез погружали на 30 мин в 10% раствор PVP в этиловом спирте с концентрацией 25%. После этого протез извлекали из раствора PVP и сушили в горизонтальном положении в течение 24 ч. Затем проводили полимеризацию PVP к поверхности сосудистого протеза посредством ионизирующего излучения с общей поглощенной дозой 15 кГр с использованием им-

пульсного линейного ускорителя ИЛУ-10 с энергией пучка 5МэВ 50 кВТ (производитель – Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Россия). Выбранная доза ионизирующего излучения позволила одновременно провести и модифицирование, и стерилизацию сосудистых протезов, поэтому дальнейшее формирование лекарственного покрытия проводили в стерильных условиях. Позже в стерильных условиях к гидрогелевому покрытию из PVP методом комплексообразования присоединяли антиагрегант илопрост (Ilo) и нефракционированный гепарин (Hep) [11].

В итоге были получены опытные образцы биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo}.

Имплантация сосудистых протезов

Изготовленные сосудистые протезы PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} длиной 40 мм диаметром 4 мм были имплантированы в сонную артерию восьми овец эдильбаевской породы по методике «конец в конец» по схеме: 1 животное – 1 протез. Срок имплантации – 12 мес.

Для оценки проходимости имплантированных трансплантатов было проведено ультразвуковое исследование с функцией доплера на аппарате M7 Premium (Mindray, Китай): 1 и 5 сут, 1, 3, 6, 9 и 12 мес. после имплантации – для проходимых сосудистых протезов; 1 и 5 сут – для тромбированных протезов.

Послеоперационное медикаментозное ведение: антибиотикотерапия (аксетин (цефуросим) 1,5 г – в/м 2 р/сут + энксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл в течение 5 дней. При доказанной проходимости биodeградируемых протезов: клопидогрел 75 мг перорально 1 р/сут + гепарин натрия 5000 ЕД подкожно 2 р/сут) – в течение 1 мес.

Гистологическое исследование

Эксплантированные образцы сосудистых протезов были окрашены на гематоксилин-эозин и по Ван-Гизону. Новообразованную ткань, сформированную на основе сосудистых протезов, окрашенных на гематоксилин-эозин и по Ван-Гизону, оценивали в сравнении с эксплантированными контралатеральными интактными сонными артериями.

Эксплантированные образцы фиксировали в 10% забуференном формалине в течение суток, после для удаления излишков фиксирующего раствора промывали в проточной воде, затем обезжировали в 6 порциях IsoPrep (BioVitrum, Россия). Пропитывали образцы парафином (3 порции) при 56 °С в течение 60 мин в каждой порции. Пропитанные образцы заливали в тугоплавкий парафин ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США). Изготовленные образцы подсушивали в термостате в течение ночи при 37 °С. Затем образцы депарафинизировали в 3 порциях о-ксилоле в течение 1–2 мин в каждой и дегидратировали в 3 порциях 96% спирта по 1–2 мин. Далее депарафинированные срезы окрашивали в соответствии с протоколом исследования. Образцы исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива ×50, ×100 и ×200.

Иммунофлуоресцентное исследование

Эксплантированные участки сосудистых протезов и контралатеральных интактных сонных артерий овец замораживали при температуре –120 °С. Замороженные

образцы фиксировали в криосреде Tissue-Tek (Sakura, Япония) и изготавливали срезы толщиной 8 мкм на криостате CryoStar NX50 (Thermo Scientific, США). Затем проводили непрямо флуоресцентное окрашивание изготовленных срезов на CD31, vWF (von Willebrand factor), α -actin, collagen I, III, IV типа (Abcam, Англия). Ядра клеток контрастировали DAPI (Sigma, США). Контрольные образцы готовили аналогично опытным, но вместо первичных антител использовали 1% BSA. Готовые стекла заключали в ProLong (Life Technologies, США) под покровное стекло. Изготовленные препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Анализ уровня мРНК

Для выделения РНК были отобраны образцы сосудистых протезов и интактных сонных артерий, эксплантированных из экспериментальных животных. Пробоподготовку проводили по ранее описанной методике [12]. Выделение общей РНК осуществляли при помощи коммерческого набора RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Качество и количество выделенной РНК оценивали на приборе Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, США). Оцен-

ку экспрессии генов (*IL1B*, *IL6*, *VEGFA*, *CXCL8*, *CXCR4*, *NR2F2*, *SNAI2*, *ICAM1*, *YAP1*, *KDR*, *FGF2*, *MMP2*) проводили методом кПЦР с обратной транскрипцией. В качестве референсных использовали гены АСТВ, GAPDH, B2M. Уровень генов интереса рассчитывали по методу Δ Ct и 2- $\Delta\Delta$ Ct, значения выражали в условных единицах (у.е.).

Результаты и обсуждение

Результаты ультразвукового исследования с функцией доплера

По результатам ультразвукового исследования с функцией доплера проходимость сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo} через 1 сут после имплантации в сонную артерию овец составила 62,5% (5 из 8) (рис. 1). По окончании срока имплантации (12 мес.) проходимыми оставались 50,0% имплантированных протезов (4 из 8). Однако во всех проходимых протезах уже через 1,5 мес. имплантации обнаружена тенденция к увеличению диаметра с четкими признаками формирования аневризматического расширения по всей длине протеза через 6 мес. наблюдения. Вследствие аневризмобразования диаметр протезов спустя 12 мес. имплантации увеличился до 2,4 см (см. рис. 1).

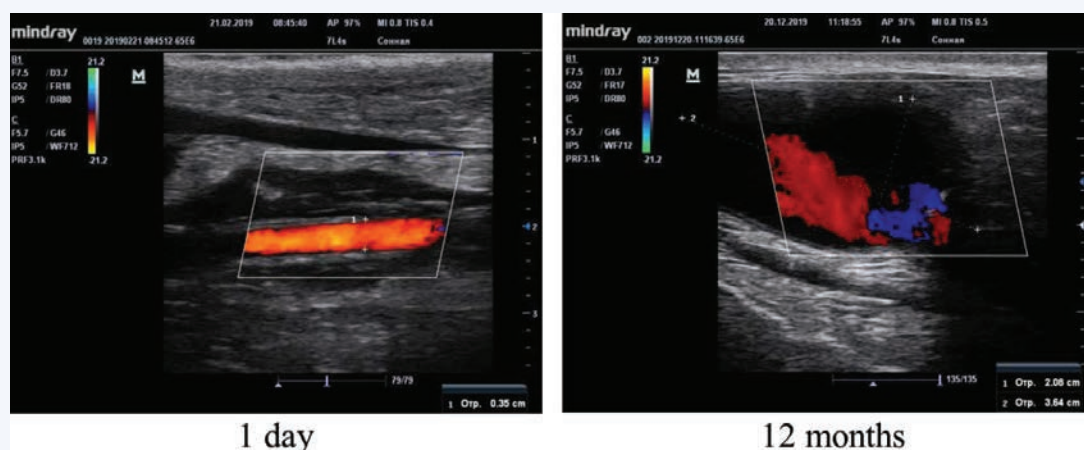


Рис. 1. Результаты ультразвукового исследования с функцией доплера проходимости протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo}
Fig. 1. The results of an ultrasound examination with the Doppler function of the patency of the PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo} prostheses

Результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований

Результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований эксплантированных образцов протезов и контралатеральных сонных артерий выявили, что биodeградируемый каркас PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo} практически полностью резорбировался с образованием аневризм на всем протяжении протеза (рис. 2). На его месте выявлено формирование трехслойного новообразованного сосуда, схожего по своему строению с нативной сонной артерией овцы. На внутренней стороне неоинтимы новообразованного сосуда визуализировался слой эндотелиоподобных клеток (см. рис. 2).

Медиа представлена клетками, по морфологии схожими с гладкомышечными. За гладкомышечным слоем следовал слой соединительной ткани и адвентиция, тол-

ща которой содержала в себе фибробластоподобные и гигантские многоядерные клетки, большое количество новообразованных сосудов, лимфатические фолликулы, а также небольшое количество периваскулярной жировой ткани. Однако новообразованная сосудистая ткань отличалась от интактной сонной артерии овцы отсутствием эластических волокон и четкой вытянутости цитоплазмы гладкомышечных клеток. Также в эндотелиальных клетках новообразованного эндотелиального монослоя на внутренней поверхности PHBV/PCL/GFmix с лекарственным покрытием выявлены признаки эндотелиально-мезенхимального перехода (одновременная экспрессия эндотелиальными клетками CD31, vWF и α -актина) (см. рис. 2).

Базальная мембрана содержала коллаген I и IV типа. Коллаген III типа также обнаружен в стенке ремоделированного протеза (рис. 3).

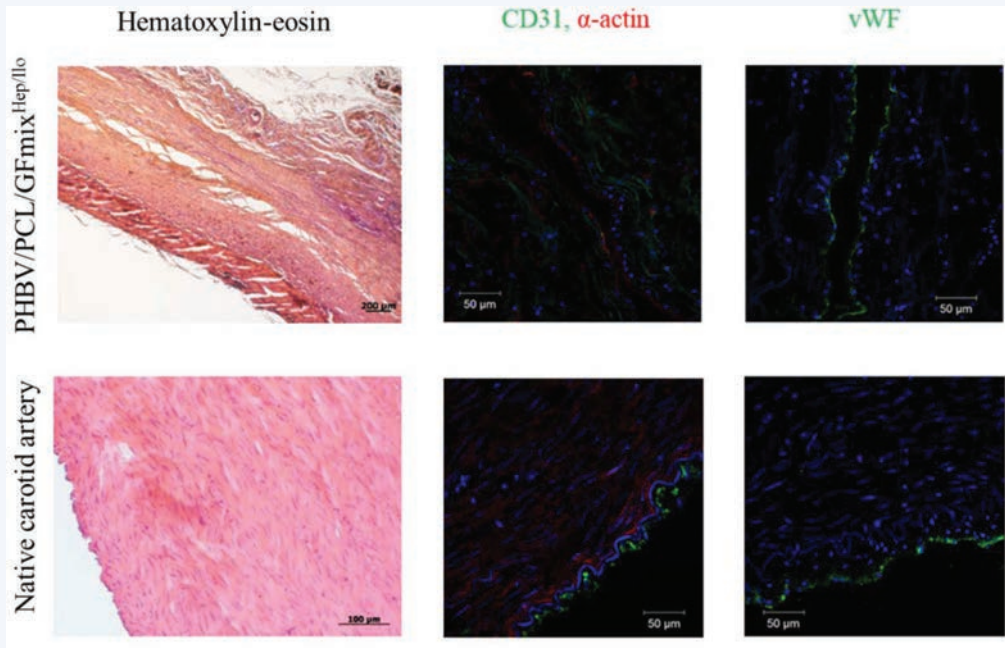


Рис. 2. Сравнение результатов гистологического и иммунофлуоресцентного исследований протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и интактной сонной артерии овцы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$. Окраска на CD31 (зеленое свечение), α -actin (красное свечение), vWF (зеленое свечение), $\times 200$

Fig. 2. Comparison of the results of histological and immunofluorescence studies of PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo prostheses and intact sheep carotid artery. Hematoxylin-eosin staining, $\times 50$. Staining for CD31 (green glow), α -actin (red glow) and vWF (green glow), $\times 200$

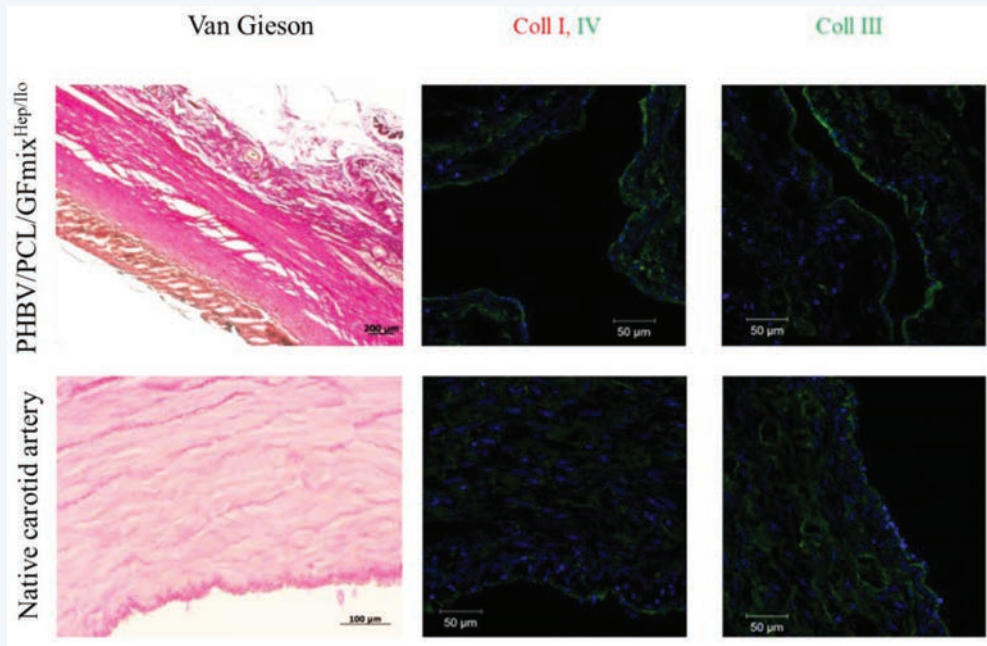


Рис. 3. Сравнение результатов гистологического и иммунофлуоресцентного исследований протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и нативной артерии овцы. Окраска по Ван-Гизону, $\times 50$. Окраска на Collagen I, III, IV (зеленое свечение), $\times 200$

Fig. 3. Comparison of the results of histological and immunofluorescent studies of prostheses and native sheep arteries. Coloring according to Van-Gieson, $\times 50$. Coloring for Collagen I, III, IV (green glow), $\times 200$

Результаты оценки профиля экспрессии генов

Сравнительный анализ профиля генной экспрессии в гомогенатах ткани, полученных из ремоделированного сосудистого протеза, характеризовался обилием транскриптов, связанных с воспалением (*IL1B*, *IL6* и *CXCL8*),

ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса (*MMP2*) и эндотелиально-мезенхимальным переходом (*SNAI2*), чего не наблюдали в контралатеральной сонной артерии овцы. Эндотелиальный лизат был обогащен воспалительными транскриптами (*IL1B*, *IL6* и *ICAM1*) и признаками репрограммирования эндотелия (венозный

транскрипт *NR2F2* и маркер эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI2*) (табл. 1, 2). В связи с этим можно предположить, что молекулярный ландшафт сосудистой ткани, формирующейся на месте биодеградируе-

мого сосудистого протеза, может отличаться от соответствующих кровеносных сосудов даже при регенерации артерий в долгосрочной перспективе (12 мес. после имплантации).

Таблица 1. Транскрипционный профиль регенерированных на месте сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и intactных контралатеральных сонных артерий через 12 мес. после имплантации: уровень экспрессии в условных единицах $m \pm SD$

Table 1. Transcriptional profile of in situ regenerated vascular prostheses PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo and intact contralateral carotid arteries 12 months after implantation: expression level in conventional $m \pm SD$ units

Ген Gene	Интactная сонная артерия (гомогенат) Intact carotid artery (homogenate)	Графт (гомогенат) Graft (homogenate)	Интactная сонная артерия (смыв) Intact carotid artery (flush)	Графт (смыв) Graft (flush)
IL1B	0,000186 ± 0,000055	0,000594 ± 0,000713	0,000579 ± 0,000073	0,005530 ± 0,001007
IL6	0,001678 ± 0,000702	0,001533 ± 0,000900	0,001058 ± 0,000170	0,003976 ± 0,000091
CXCL8	0,000689 ± 0,000332	0,001904 ± 0,000379	0,001928 ± 0,002761	0,004351 ± 0,000618
IL10	-	-	-	-
IL12A	-	-	-	-
IL12B	-	-	-	-
TNF	-	-	-	-
IFNG	-	-	-	-
CXCR4	0,017592 ± 0,005557	0,025238 ± 0,018372	0,062432 ± 0,002754	0,047241 ± 0,012453
NOS3	-	-	-	-
VEGFA	0,023848 ± 0,009059	0,019827 ± 0,011576	0,006904 ± 0,003760	0,006484 ± 0,001813
FGF2	0,070019 ± 0,016891	0,013054 ± 0,003294	0,015252 ± 0,006000	0,012227 ± 0,003214
TGFB	-	-	-	-
ICAM1	0,020364 ± 0,018289	0,006392 ± 0,001281	0,005075 ± 0,001121	0,004993 ± 0,001278
MMP2	0,084705 ± 0,034208	1,134578 ± 1,216459	0,006230 ± 0,004468	0,051311 ± 0,002237
KDR	0,057268 ± 0,052768	0,017468 ± 0,005699	0,002294 ± 0,000830	-
YAP1	0,173951 ± 0,063811	0,032772 ± 0,032010	0,012259 ± 0,003241	0,007270 ± 0,001915
NR2F2	0,012703 ± 0,010607	0,007789 ± 0,002543	0,000684 ± 0,001160	0,000958 ± 0,000214
SNAI2	0,156352 ± 0,072169	0,176597 ± 0,172171	0,001378 ± 0,000674	0,014902 ± 0,003125

Таблица 2. Транскрипционный профиль регенерированных на месте сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и intactных контралатеральных сонных артерий через 12 мес. после имплантации: относительный уровень экспрессии (кратность изменения относительно контроля)

Table 2. Transcriptional profile of in situ regenerated PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo vascular prostheses and intact contralateral carotid arteries 12 months after implantation: relative expression level (fold change relative to control)

Ген Gene	Интactная сонная артерия (гомогенат) Intact carotid artery (homogenate)	Графт (гомогенат) Graft (homogenate)	Интactная сонная артерия (смыв) Intact carotid artery (flush)	Графт (смыв) Graft (flush)
IL1B	1	3,19	1	9,55
IL6	1	0,91	1	3,76
CXCL8	1	2,76	1	2,26
IL10	-	-	-	-
IL12A	-	-	-	-
IL12B	-	-	-	-
TNF	-	-	-	-
IFNG	-	-	-	-
CXCR4	1	1,43	1	0,76
NOS3	-	-	-	-
VEGFA	1	0,83	1	0,94
FGF2	1	0,19	1	0,80
TGFB	-	-	-	-
ICAM1	1	0,31	1	0,98
MMP2	1	13,39	1	8,24
KDR	1	0,31	1	-
YAP1	1	0,19	1	0,59
NR2F2	1	0,61	1	1,40
SNAI2	1	1,13	1	10,81

Обсуждение

Несмотря на активные усилия по разработке биодеградируемого сосудистого протеза малого диаметра, обладающего биосовместимостью, прочностью, способностью к адаптивному росту и устойчивостью к развитию

кальцификации, текущие достижения в этой области ограничены экспериментальными прототипами, демонстрирующими в лучшем случае 50% первичную проходимость в долгосрочном периоде (например, через 1 год после имплантации) [13, 14].

Одним из популярных подходов создания тканеинженерных сосудистых протезов является выращивание нового здорового сосуда на базе функционально активного каркаса, способного задавать привлекаемым клеткам вектор развития в сторону формирования новообразованной сосудистой ткани. При этом каркас протеза в идеале может полностью рассасываться во времени. При этом для эффективной биофункционализации сосудистых протезов очень важно понимать синергизм взаимодействий биологически активных компонент, которые вводятся в состав протеза.

В НИИ КПССЗ был разработан и протестирован в условиях *in vitro* и в экспериментах *in vivo* на мелких лабораторных животных сосудистый протез диаметром 1,5 мм, изготовленный из биodeградируемых полимеров полигидроксибутирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL) и содержащий в своем составе проангиогенные факторы: VEGF, bFG и SDGF-1a, послойно инкорпорированных в стенку протеза в процессе электроспиннинга. VEGF был призван активировать и поддерживать миграцию, пролиферацию, выживание и дифференцировку эндотелиальных клеток, увеличивать продукцию оксида азота и усиливать сосудистую проницаемость. bFGF ответственен за миграцию, пролиферацию и выживание эндотелиальных и гладкомышечных клеток, обеспечение созревания кровеносных сосудов. SDF-1a является хемоаттрактантом, поэтому способен усиливать миграцию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые могут дифференцироваться в гладкомышечном направлении внутри сосудистой стенки. Пройдемость разработанных протезов спустя 12 мес. имплантации в аорту крысы близилась к 100%. Заселение клетками пористой стенки биodeградируемого протеза после его имплантации в сосудистое русло происходило благодаря естественным процессам ремоделирования имплантата с формированием трехслойной новообразованной сосудистой ткани, схожей со строением стенки нативного сосуда. Было доказано образование устойчивого эндотелиального монослоя, что является критичным моментом для обеспечения долгосрочной эффективности протезов после их имплантации в сосудистое русло [15].

Данные обнадеживающие результаты сподвигли на проведение преclinical испытаний разработанных сосудистых протезов на модели крупных лабораторных животных. В качестве модели выбраны овцы, которые обладают схожей с человеком физиологией сердечно-сосудистой системы, особенно механизмов гемостаза. Считается, что овцы пригодны для моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их сосудов к тромбозу и кальцификации, что позволяет провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов [16]. Плюс на модели, приближенной к человеку, гораздо эффективнее выявлять весь спектр возможных рисков несостоятельности разрабатываемого изделия; в нашем случае как минимум потому, что в сосудистое русло овцы можно вшить гораздо более длинный протез, который не сможет так же быстро эндотелиализоваться, как на модели крысы. В итоге на двух животных моделях получены настолько разные и неожиданные результаты, что в дальнейшем пришлось значительно менять технологию изготовления протеза.

Так, в пилотных исследованиях на овцах в 100% случаев в раннем послеоперационном периоде получен тромбоз биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix, не содержащих лекарственного покрытия. Запуск тромбообразования, по-видимому, был спровоцирован пористостью внутренней поверхности протеза [17]. Исходя из этого, нами был разработан подход поверхностного модифицирования протезов антикоагулянтом нефракционированным гепарином и антиагрегантом илопростом с целью повышения гемосовместимых свойств протезов [11], что повысило проходимость протезов с 0 до 50%.

Также ранее нами было определено, что само оперативное вмешательство на столь агрессивной в плане тромбообразования животной модели способно внести свою лепту в итоговую проходимость оперированного сосуда. С этой целью была выполнена аутоартериальная имплантация с выводом животных из эксперимента через год. Выявлено, что полную проходимость реоперированные сонные артерии сохраняли только в 87,5% случаев [17]. Таким образом, оперативное вмешательство способно дополнительно снижать процент проходимости оперированных сосудов в 12,5% случаев.

Вторая неожиданная находка заключалась в крайне быстрой резорбции полимерного каркаса сосудистого протеза, что привело к аневризмообразованию всех проходимых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Illo} с лекарственным покрытием. Начало формирования аневризм зафиксировано спустя 1,5 мес. имплантации. Апогей аневризмообразования пришелся на период 6 мес. имплантации с последующей стабильной картиной в последующие 6 мес. наблюдения за имплантированными сосудистыми протезами. В литературе имеются сообщения об ускоренной деградации полимерных каркасов у овец по сравнению с крысами или другими животными моделями [18]. Мы получили аналогичные результаты на модели овцы, хотя в наших собственных предшествующих экспериментах на модели крысы даже спустя 12 мес. имплантации аналогичные протезы сохраняли свою начальную геометрию, а скорость биорезорбции полимеров, полученная нами в экспериментах *in vivo*, соответствовала литературным данным [5, 19.]

Таким образом, несмотря на то, что биodeградируемый сосудистый протез PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Illo} показал высокую биосовместимость и пригодность для замещения новообразованной сосудистой тканью без инициации процессов воспаления и кальцификации, разработанная конструкция требует укрепления внешнего каркаса и дополнительного повышения атромбогенных свойств внутренней поверхности с целью достижения 100% проходимости в долгосрочной перспективе.

Заключение

Результаты проведенного исследования продемонстрировали хорошую пригодность сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Illo} с лекарственным покрытием для формирования на его основе новообразованной сосудистой ткани, которая оказалась очень схожей по морфологии с протезируемой сонной артерией овцы. Однако в связи с наличием факта аневризмообразования требуется проведение дополнительного укрепления каркаса протеза и повышения атромбогенных свойств внутренней поверхности.

Литература / References

1. Husain M.J., Datta B.K., Kostova D., Joseph K.T., Asma S., Richter P. et al. Access to cardiovascular disease and hypertension medicines in developing countries: an analysis of essential medicine lists, price, availability, and affordability. *J. Am. Heart Assoc.* 2020;9(9):e015302. DOI: 10.1161/JAHA.119.015302.
2. Naegeli K.M., Kural M.H., Li Y., Wang J., Hugentobler E.A., Niklason L.E. Bioengineering human tissues and the future of vascular replacement. *Circ. Res.* 2022;131:109–126. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319984.
3. Iwaki R., Shoji T., Matsuzaki Y., Ulziibayar A., Shinoka T. Current status of developing tissue engineering vascular technologies. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2022;22:433–440. DOI: 10.1080/14712598.2021.1960976.
4. Wei Y., Wang F., Guo Z., Zhao Q. Tissue-engineered vascular grafts and regeneration mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2022;165:40–53. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2021.12.010.
5. Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Mironov A.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Matveeva V.G. et al. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2018;7(2):25–36. DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-86-96.
6. Matsuzaki Y., Ulziibayar A., Shoji T., Shinoka T. Heparin-eluting tissue-engineered bioabsorbable vascular grafts. *Appl. Sci.* 2021;11:4563. DOI: 10.3390/app11104563.
7. Stowell C.E.T., Li X., Matsunaga M.H., Cockreham C.B., Kelly K.M., Cheatham J. et al. Resorbable vascular grafts show rapid cellularization and degradation in the ovine carotid. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020;14(11):1673–1684. DOI: 10.1002/term.3128.
8. L'Heureux N., McAllister T.N., de la Fuente L.M. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N. Engl. J. Med.* 2007;357(14):1451–1453. DOI: 10.1056/NEJMc071536.
9. Matsuzaki Y., Miyamoto S., Miyachi H., Iwaki R., Shoji T., Blum K. et al. Improvement of a novel small-diameter tissue-engineered arterial graft with heparin conjugation. *Ann. Thorac. Surg.* 2021;111:1234–1241. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2020.06.112.
10. Zhu T., Gu H., Ma W., Qilu Z., Du J., Chen S. et al. A fabric reinforced small diameter tubular graft for rabbits' carotid artery defect. *Composites. Part B: Engineering.* 2021;225:109274. DOI: 10.1016/j.compositesb.2021.109274.
11. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Резцова М.А., Кривкина Е.О., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л. и др. Технология изготовления функционально активных биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием: пат. 2702239. Заявитель и патентообладатель – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ) (RU); № 2019119912; заявл. 25.06.2019; опубл. 07.10.2019, Бюл. № 28. [Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Rezvova M.A., Krivkina E.O., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L. et al. Manufacturing technology of functionally active biodegradable vascular prostheses of small diameter with drug coating: Pat. 2702239. Applicant and patent holder Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases" (NII KPSSZ) (RU); No. 2019119912; dec. 06/25/2019; publ. 07.10.2019, Bull. No. 28. (In Russ.)].
12. Антонова Л.В., Кривкина Е.О., Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Миронов А.В. и др. Результаты преклинических испытаний биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели овцы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2022;24(3):80–93. [Antonova L.V., Krivkina E.O., Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Mironov A.V. et al. Results of preclinical trials in a sheep model of biodegradable small-diameter vascular grafts. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2022;24(3):80–93. (In Russ.)]. DOI: 10.15825/1995-1191-2022-3-80-93.
13. Fang S., Ellman D.G., Andersen D.C. Review: Tissue engineering of small-diameter vascular grafts and their in vivo evaluation in large animals and humans. *Cells.* 2021;10:713. DOI: 10.3390/cells10030713.
14. Durán-Rey D., Crisóstomo V., Sánchez-Margallo J.A., Sánchez-Margallo F.M. Systematic review of tissue-engineered vascular grafts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:771400. DOI: 10.3389/fbioe.2021.771400.
15. Antonova L., Kutikhin A., Sevostianova V., Velikanova E., Matveeva V., Glushkova T. et al. bFGF and SDF-1 α improve in vivo performance of VEGF-incorporating small-diameter vascular grafts. *Pharmaceuticals.* 2021;14:302. DOI: 10.3390/ph14040302.
16. Koch S.E., de Kort B.J., Holshuisen N., Brouwer H.F.M., van der Valk D.C., Dankers P.Y.W. et al. Animal studies for the evaluation of in situ tissue-engineered vascular grafts – a systematic review, evidence map, and meta-analysis. *NPJ Regen. Med.* 2022;7:17. DOI: 10.1038/s41536-022-00211-0.
17. Antonova L.V., Mironov A.V., Yuzhalin A.E., Krivkina E.O., Shabaev A.R., Rezvova M.A. et al. A brief report on an implantation of small-caliber biodegradable vascular grafts in a carotid artery of the sheep. *Pharmaceuticals.* 2020;13:101. DOI: 10.3390/ph13050101.
18. Fukunishi T., Ong C.S., Yesantharao P., Best C.A., Yi T., Zhang H. et al. Different degradation rates of nanofiber vascular grafts in small and large animal models. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020;14:203–214. DOI: 10.1002/term.2977.
19. Насонова М.В., Шишкова Д.К., Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л. и др. Результаты субкутанной имплантации полимерных матриц на основе поликапролактона и полигидроксипропирилатов, модифицированных ростовыми факторами. *Соврем. технол. мед.* 2017;2:7–18. [Nasonova M.V., Shishkova D.K., Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L. et al. Results of subcutaneous implantation of polymer matrices based on polycaprolactone and polyhydroxybutyrate modified by growth factors. *Sovremennye tekhnologii v medicine.* 2017;2:7–18. (In Russ.)]. DOI: 10.17691/stm2017.9.2.01.

Информация о вкладе авторов

Кривкина Е.О. – разработка дизайна исследования, изготовление сосудистых протезов, гистологическое исследование эксплантационных образцов сосудистых протезов, литературный поиск, анализ литературы, написание статьи.

Миронов А.В. – имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец, анализ полученных результатов.

Шабеев А.Р. – имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец, анализ полученных результатов.

Великанова Е.А. – работы по проведению иммунофлуоресцентного исследования эксплантационных образцов сосудистых протезов, анализ и интерпретация данных.

Ханова М.Ю. – работы по имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овец, анализ и интерпретация данных.

Синицкая А.В. – проведение экспериментов (анализ генной экспрессии), анализ и интерпретация данных.

Антонова Л.В. – руководство работой, разработка дизайна исследования, работы по проведению научного исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи.

Барбараш Л.С. – руководство работой, разработка дизайна исследования, экспертиза окончательного варианта статьи.

Information on author contributions

Krivkina E.O. – study design development, vascular prosthesis fabrication, histological examination of explanted samples of vascular prostheses, literature search and analysis, article writing.

Mironov A.V. – implantation of vascular prostheses in the carotid artery of sheep, results analysis.

Shabaev A.R. – implantation of vascular prostheses in the carotid artery of sheep, results analysis.

Velikanova E.A. – work on the immunofluorescence study of explanted samples of vascular prostheses, data analysis and interpretation.

Khanova M.Yu. – work on the implantation of vascular prostheses in the carotid artery of sheep, data analysis and interpretation.

Sinitskaya A.V. – conducting experiments (analysis of gene expression), data analysis and interpretation.

Antonova L.V. – head of work, development of research design, work on conducting scientific research, data analysis and interpretation, writing an article.

Barbarash L.S. – head of work, development of research design, revision of the final version of the article.

Сведения об авторах

Кривкина Евгения Олеговна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Миронов Андрей Владимирович, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8846-5077.

E-mail: a.mir.80@mail.ru.

Шабает Амин Рашитович, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-9734-8462.

E-mail: shabar@kemcardio.ru.

Великанова Елена Анатольевна, научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Ханова Марьям Юрисовна, младший сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: khanovam@gmail.com.

Синицкая Анна Викторовна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4467-8732.

E-mail: cepoav1991@gmail.com.

Антонова Лариса Валерьевна, д-р мед. наук, заведующий лабораторией клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antonova.la@mail.ru.

Барбараш Леонид Семенович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-2814-4300.

E-mail: reception@kemcardio.ru.

 **Кривкина Евгения Олеговна**, e-mail: leonora92@mail.ru.

Information about the authors

Evgeniya O. Krivkina, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Andrei V. Mironov, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-8846-5077.

E-mail: a.mir.80@mail.ru.

Amin R. Shabaev, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-9734-8462.

E-mail: shabar@kemcardio.ru.

Elena A. Velikanova, Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Maryam Y. Khanova, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: khanovam@gmail.com.

Anna V. Sinitskaya, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-4467-8732.

E-mail: cepoav1991@gmail.com.

Larisa V. Antonova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antonova.la@mail.ru.

Leonid S. Barbarash, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Leading Research Scientist, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-2814-4300.

E-mail: reception@kemcardio.ru.

 **Evgeniya O. Krivkina**, e-mail: leonora92@mail.ru.

Поступила 10.11.2022

Received November 10, 2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-160-166>
УДК 616.1-77:[576.311.34:547.962]:57.085.23

Анализ эффективности различных белковых покрытий для оптимизации эндотелизации полимерных матриц

Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Е.А. Сенокосова, М.Ю. Ханова,
Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Аннотация

Обоснование. В связи с постоянным увеличением количества операций по восстановлению кровотока в пораженных сосудах актуальна разработка синтетических протезов. Одним из ключевых факторов их успешности является повышение адгезионных свойств внутренней поверхности, поскольку быстрая эндотелизация сосудистых протезов считается фактором, необходимым для предотвращения тромбозов и гипертрофии неоинтимы.

Цель исследования: определить влияние модификации поверхности полимерных матриц фибрином, фибронектином или коллагеном I типа на адгезию и жизнеспособность эндотелиальных клеток.

Методология и методы исследования. Исследовали полимерные матрицы, изготовленные методом электроспиннинга из смеси поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и поли(ε-капролактона). Образцы матриц покрывали коллагеном I типа, фибронектином или фибрином. Затем на матрицы заселяли эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), культивировали 3 сут. В качестве контроля использовали немодифицированные матрицы и лунки культурального планшета. Жизнеспособность клеток оценивали сочетанной окраской Hoechst 33342 и этидиум бромидом. Метаболическую активность клеток изучали с помощью МТТ-теста. Адгезию клеток анализировали по окрашиванию на F-актин. Статистический анализ результатов выполняли в программе GraphPrism 7.0.

Результаты. Установлено, что по количеству адгезированных клеток и их метаболической активности матрицы с коллагеном не отличались от немодифицированных. Покрытие фибронектином продемонстрировало более высокие показатели адгезии клеток к поверхности. Однако достаточно высокий уровень гибели клеток в этой группе указывает на то, что подобная модификация не может в полной мере обеспечить нормальное функционирование клеток. Наконец, наилучшие результаты мы наблюдали при использовании фибринового покрытия, которое по показателям адгезии и жизнеспособности эндотелиальных клеток было сравнимо с культуральным пластиком.

Заключение. Модификация поверхности полимерных матриц фибрином позволяет значительно улучшить их адгезионные свойства и может быть использована при разработке полимерных протезов сосудов малого диаметра.

Ключевые слова:	тканевая инженерия, протезы сосудов малого диаметра, электроспиннинг, фибрин, эндотелиальные клетки.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации № 075-15-2022-1202 от 30 сентября 2022 г., заключенного в целях реализации Распоряжения Правительства Российской Федерации от 11 мая 2022 г. № 1144-р.
Для цитирования:	Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Сенокосова Е.А., Ханова М.Ю., Кривкина Е.О., Антонова Л.В. Анализ эффективности различных белковых покрытий для оптимизации эндотелизации полимерных матриц. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):160–166. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-160-166 .

Великанова Елена Анатольевна, e-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Analysis of the effectiveness of various protein coatings for optimizing the endothelialization of polymer matrices

Elena A. Velikanova, Vera G. Matveeva, Evgeniya A. Senokosova,
Mariam U. Khanova, Evgeniya O. Krivkina, Larisa V. Antonova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6, Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Background. Due to the constant increase in the number of surgeries to restore blood flow in the affected vessels, the development of synthetic prostheses is relevant. One of the key success factors is an increase in the adhesive properties of the inner surface, since the rapid endothelialization of vascular prostheses is considered a factor necessary to prevent thrombosis and neointimal hypertrophy.

Aim: To determine the effect of surface modification of polymer matrices with fibrin, fibronectin, or type I collagen on the adhesion and viability of endothelial cells.

Material and Methods. Polymer matrices prepared by electrospinning from a mixture of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) were studied. Matrix samples were coated with type I collagen or fibronectin or fibrin. Then, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were colonized on the matrices and cultured for 3 days. Unmodified matrices and culture plate wells were used as controls. Cell viability was assessed by combined staining with Hoechst 33342 and ethidium bromide. The metabolic activity of the cells was studied using the MTT test. Cell adhesion was analyzed by staining for F-actin. Statistical analysis of the results was performed using the GraphPrism 7.0 program.

Results. It was found that the number of adherent cells and their metabolic activity of matrices with collagen did not differ from unmodified ones. Coating with fibronectin demonstrated higher rates of cell adhesion to the surface. However, a rather high level of cell death in this group indicates that such a modification cannot fully ensure the normal functioning of cells. Finally, we observed the best results when using a fibrin coating, which was comparable to culture plastic in terms of adhesion and viability of endothelial cells.

Conclusion. Modification of the surface of polymer matrices with fibrin can significantly improve their adhesive properties and can be used in the development of polymer prostheses for small-diameter vessels.

Keywords:	tissue engineering, small-diameter vessel prostheses, electrospinning, fibrin, endothelial cells
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Agreement on the provision of grants from the federal budget in the form of subsidies in accordance with paragraph 4 of Article 78.1 of the Budget Code of the Russian Federation № 075-15-2022-1202 dated September 30, 2022, concluded to implement the Order of the Russian Federation Government dated May 11, 2022 No. 1144-r.
For citation:	Velikanova E.A., Matveeva V.G., Senokosova E.A., Khanova M.U., Krivkina E.O., Antonova L.V. Analysis of the effectiveness of various protein coatings for optimizing the endothelialization of polymer matrices. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):160–166. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-160-166 .

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности в мире; по прогнозам их встречаемость к 2030 г. возрастет до 23,3 млн [1]. При этом ряд широко распространенных заболеваний и патологических состояний связаны с нарушением проходимости кровеносных сосудов. Золотым стандартом хирургического лечения в таких случаях является использование аутологических вен в качестве шунтов [2]. Однако у значительной части пациентов по разным причинам, таким как сопутствующие заболевания или отсутствие подходящего для шунта сосуда, нет возможности проведения подобной операции с использованием собственного сосуда [3]. Таким образом, актуальным остается вопрос разработки

синтетических протезов, в том числе малого диаметра (до 6 мм).

Наиболее перспективным направлением разработки протезов сосудов представляется тканевая инженерия. В основе лежит идея о конструировании каркаса из биосовместимого материала, который служит базой для заселения клетками и последующего воссоздания на месте такого протеза аналога нативного сосуда [4].

В рамках подходов к решению этого вопроса рассматриваются различные варианты заселения матриц клетками: *in vitro*, с дооперационным культивированием клеточно-заселенных протезов, *in vivo* и *in situ*, с идеей привлечения клеток в матрикс непосредственно в живом организме и управления этим процессом с помощью биологически активных молекул [5]. Но независимо от

выбранного подхода, в большинстве случаев исследователи встают перед необходимостью модификации внутренней поверхности сосудистого протеза для увеличения адгезии эндотелиальных клеток. Это крайне важный аспект разработки протеза сосуда малого диаметра, поскольку наиболее частыми осложнениями, связанными с имплантацией такого протеза, являются тромбозы и гиперплазия неоинтимы [2]. Предполагается, что быстрая эндотелизация внутренней поверхности позволит предотвратить такие проблемы [6], что возвращает к необходимости разработки покрытия, которое способно максимально поддерживать адгезию, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток.

В настоящем исследовании для модификаций полимерных матриц мы использовали белки, которые широко применяются в том числе в культуральной практике для улучшения адгезивных свойств поверхности, а именно коллаген I типа, фиброноген и фибрин. В различных исследованиях были показаны хорошие перспективы использования данных покрытий в тканевой инженерии сосудов. Так, в работах [7] и [8] показано значимое усиление эффективности реэндотелизации децеллюляризованных аорты и клапана после покрытия их фибронектином, W. Flameng и соавт. получили аналогичные результаты при использовании фибрина [9]. В нашей работе мы провели сравнительный анализ эффективности этих видов покрытий в отношении улучшения адгезии эндотелиальных клеток на поверхности полимерных матриц.

Цель работы: определить эффективность модификации поверхности полимерных матриц фибрином, фибронектином или коллагеном I типа для улучшения адгезии и поддержания жизнеспособности эндотелиальных клеток.

Материал и методы

Изготовление матриц

Полимерные матрицы изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга на установке Nanop-01A (MECC, Япония) из смеси поли(3-гидроксипропирилата-ко-3-гидроксивалерата) (Sigma-Aldrich) и поли(ε-капролактона) (Sigma-Aldrich) в соотношении 1 : 2. В качестве растворителя использовали 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich). Матрицы изготавливали с использованием иглы калибра 27G, при следующих параметрах электроспиннинга: напряжение на игле составляло 23 kV, скорость подачи раствора полимера – 0,3 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об/мин, расстояние от иглы до намоточного коллектора – 15 см. Полученные матрицы подвергали стерилизации этиленоксидом.

Из полученного матрикса вырезали образцы, которые помещали на дно лунок 24-луночного культурального планшета, затем проводили процедуру модификации поверхности.

Модификация коллагеном

Изготавливали раствор бычьего коллагена I типа (A10644-01, Invitrogen) в 0,02M уксусной кислоте в концентрации 5 мкг/мл. Полученный раствор заливали в лунки планшета с матриксами, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем раствор удаляли, трижды промывали лунки с матриксами фосфатно-солевым буфером и высушивали.

Модификация фибронектином

Изготавливали рабочий раствор фибронектина крыс в фосфатно-солевом буфере в концентрации 10 мкг/мл. Готовый раствор заливали в лунки планшета с матриксами, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем раствор удаляли и высушивали матрицы.

Модификация фибрином

Фибрин выделяли из сыворотки крови условно здоровых доноров. Подробно процедура получения фибрина описана в нашем раннем исследовании [10].

Культура клеток

Для проведения эксперимента использовали эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), выделенные ранее на базе нашей лаборатории. Клетки культивировали в среде MDCB 131 с добавками для эндотелиальных клеток. Пассажи культуры проводили по достижении 70% конfluence, клетки снимали с поверхности раствором трипсина-ЭДТА (15400054, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в концентрации 0,025%. Все манипуляции проводили в стерильных условиях, клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора при 37,0 °C 5% CO₂.

Для оценки адгезионных свойств модифицированных матриц HUVEC заседали на образцы матриц, покрытых коллагеном, фибронектином или фибрином в количестве 50 000 клеток на образец. В качестве контроля использовали клетки, культивированные на немодифицированных матрицах, а также в лунках культурального планшета.

Таким образом, в эксперименте использовали следующие группы:

- HUVEC, культивированные в лунке культурального планшета (CONTROL);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса без модификации поверхности (PHBV/PCL);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса, модифицированного коллагеном (PHBV/PCL-COL);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса, модифицированного фибронектином (PHBV/PCL-FN);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса, модифицированного фибрином (PHBV/PCL-FIBRIN).

Клетки на матрицах и пластике культивировали в стандартной культуральной среде в течение 3 сут. После окончания эксперимента проводили оценку жизнеспособности клеток методом флуоресцентной микроскопии, оценку метаболической активности клеток – с помощью МТТ-теста и окрашивание на F-актин для анализа адгезии клеток к поверхности.

Флуоресцентная микроскопия

Клетки на поверхности матрикса окрашивали ядерным красителем Hoechst (14533, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) в концентрации 10 мкг/мл в течение 10 мин. Затем к клеткам добавляли раствор этидиум бромид (46067, Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) в концентрации 30 мкг/мл, окрашивали в течение еще 2 мин и затем анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioObserver (Zeiss). Анализировали по 3 образца из каждой группы, по 10 случайно выбранных полей

зрения с каждого образца на увеличении $\times 200$. Оценивали количество живых и мертвых клеток, пересчитывали на 1 мм^2 площади поверхности.

МТТ-тест

Метаболическую активность клеток изучали с помощью МТТ-теста (Abscam, UK). Для этого в лунки планшета с культивируемыми на поверхности матрикса клетками вносили реагент в соответствии с протоколом производителя и инкубировали в течение 4 ч в условиях CO_2 -инкубатора. Затем культуральную среду с прореагировавшим реагентом переносили в лунки 96-луночного планшета и считывали оптическую плотность (ОП) на анализаторе Multiskan Sky при $\lambda 570/605 \text{ нм}$. Из каждой группы анализировали по 3 образца. Контроль измерения проводили по пустой лунке (ОПконтр). ОП каждого образца рассчитывали по формуле:

$$\text{OP} = \text{OP}_{570} / \text{OP}_{605} - \text{OP}_{\text{контр}}$$

Конфокальная микроскопия

Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание на VE-кадгерин и F-актин. Для этого клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин, затем проводили пермеабиллизацию 0,1% раствором X-100 в течение 15 мин. Перед окрашиванием внутриклеточных маркеров (vWF, F-actin) проводили пермеабиллизацию 0,01% раствором Triton X-100. Для блокировки неспецифического связывания использовали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере (BSA/PBS). После этого наносили на образцы первичные антитела кролика к CD144 человека (ab33168, Abscam) и инкубировали в течение ночи при 4°C . Затем после отмывки в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% Tween-20, на образцы наносили антитела осы к IgG кролика, конъюгированные с AF488 (A11034, Invitrogen) и фаллоидин, конъюгированный с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 568 (Alexa Fluor™ 568 Phalloidin, A12380, Thermo Fisher), инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Образцы докрасива-

ли ядерным красителем DAPI. Готовые стекла заключали в ProLong (Life Technologies, США) под стекло. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов выполняли в программе GraphPrism 7.0 (Graph Pad Software). Характер распределения данных в выборках оценивали по критерию Колмогорова – Смирнова. Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q_{25} ; Q_{75})). Для оценки статистической значимости отличий между группами использовали критерий Краскела – Уоллиса и апостериорный критерий Данна для парных сравнений. За критический уровень значимости принимали $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка жизнеспособности клеток

По результатам анализа плотности клеточных культур на образцах матрикса было показано, что в отношении адгезии клеток к поверхности покрытие коллагеном оказалось наименее эффективным из всех представленных: не было обнаружено значимых различий в количестве HUVEC на матриксах PHBV/PCL и PHBV/PCL-COL (рис. 1А). Покрытие фибронектином способствовало более эффективной адгезии и пролиферации HUVEC на поверхности матрикса, для этой группы наблюдали значимое увеличение количества клеток по сравнению с немодифицированным матриксом ($268,8$ ($169,8$; $346,1$) $\text{ед}/\text{см}^2$ против $160,4$ ($88,87$; $228,3$) $\text{ед}/\text{см}^2$, $p = 0,001$). Наилучшие результаты среди выбранных вариантов модификации поверхности продемонстрировало фибриновое покрытие. В этой группе наблюдали выраженное увеличение количества адгезированных клеток ($407,5$ ($352,6$; $434,2$) $\text{ед}/\text{см}^2$), значимо отличающееся от всех групп матриц ($p = 0,001$).

Для более углубленного анализа способности представленных образцов матриц сохранять жизнеспособность клеток на их поверхности изучили соотношение живых и мертвых клеток (рис. 1В).

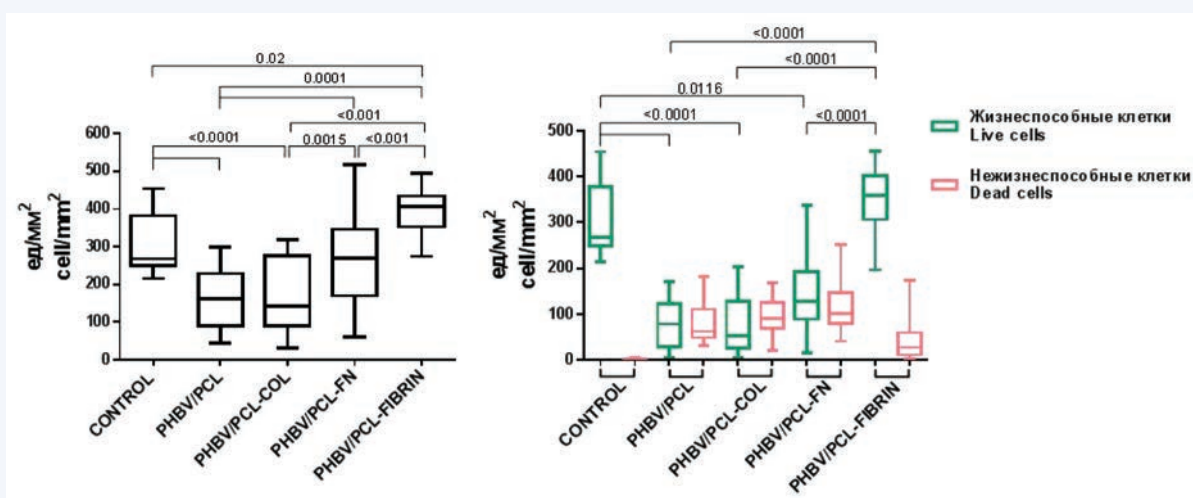


Рис. 1. Оценка плотности клеточной культуры (А) и жизнеспособности HUVEC (В), адгезировавших на поверхности полимерных матриц и культурального пластика. На диаграмме представлены медианы, 25-й и 75-й процентиля, минимальные и максимальные значения показателя. Значения p приведены над скобками

Fig. 1. Evaluation of cell culture density (A) and viability of HUVEC (B) adhering to the surface of polymer matrices and culture plastic. The diagram shows medians, 25th and 75th percentiles, minimum and maximum values. The p values are given above the brackets

В целом полученные результаты соотносились с данными о плотности клеточной культуры на поверхности образцов. Однако при статистически значимом увеличении количества клеток на поверхности PHBV/PCL-FN мы не наблюдали аналогичной разницы в жизнеспособности клеточной культуры. Достаточно высокий уровень погибших клеток в этой группе (101,2 (80,20;147,4) ед/см²) позволяет предположить, что хотя покрытие фибронектином успешно создает условия для эффективного прикрепления клеток к поверхности, подобная модификация не может в полной мере обеспечить нормальное функционирование клеток. Как и в случае с плотностью культуры, наилучшие результаты мы наблюдали в группе PHBV/PCL-FIBRIN. Количество живых клеток на поверхности этих матриц в несколько раз превышало значения, полученные с остальных матриц. С учетом достаточно низкого уровня гибели клеток фибриновое покрытие было сравнимо с культуральным пластиком в отношении адгезии и пролиферации клеток на поверхности.

Аналогичные результаты были получены при анализе метаболической активности клеток (рис. 2). Наихудшие значения наблюдали у группы PHBV/PCL; показатели матриц PHBV/PCL-COL были несколько выше, однако значимо не отличались от немодифицированных матриц. Метаболическая активность матриц PHBV/PCL-FN была значимо выше по сравнению с PHBV/PCL ($p = 0,0013$); при модификации матриц фибрином наблюдали еще большее увеличение показателя ($p < 0,0001$ по сравнению с PHBV/PCL). Интересно, что метаболическая активность в группе PHBV/PCL-FIBRIN превышала даже показатели клеток на культуральном пластике.

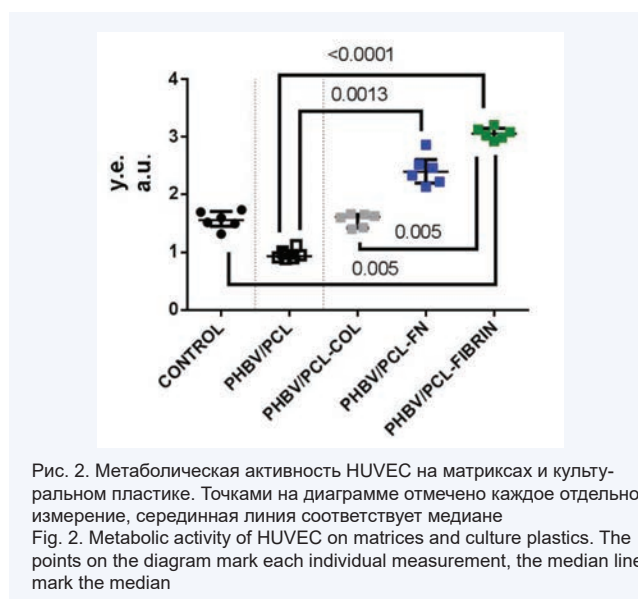


Рис. 2. Метаболическая активность HUVEC на матрицах и культуральном пластике. Точками на диаграмме отмечено каждое отдельное измерение, серединная линия соответствует медиане
Fig. 2. Metabolic activity of HUVEC on matrices and culture plastics. The points on the diagram mark each individual measurement, the median line mark the median

Очевидно, что при увеличении количества клеток будут получены более высокие значения поглощения формазана в этом тесте, поэтому можно было ожидать, что результаты в группе PHBV/PCL-FN будут выше, чем в других экспериментальных группах. Тем не менее полученные результаты позволяют также судить о сохранении высокого уровня функциональной активности клеток, адгезированных на фибриновом покрытии.

На основе окрашивания клеток на F-актин проводили анализ адгезии HUVEC к поверхности (рис. 3).

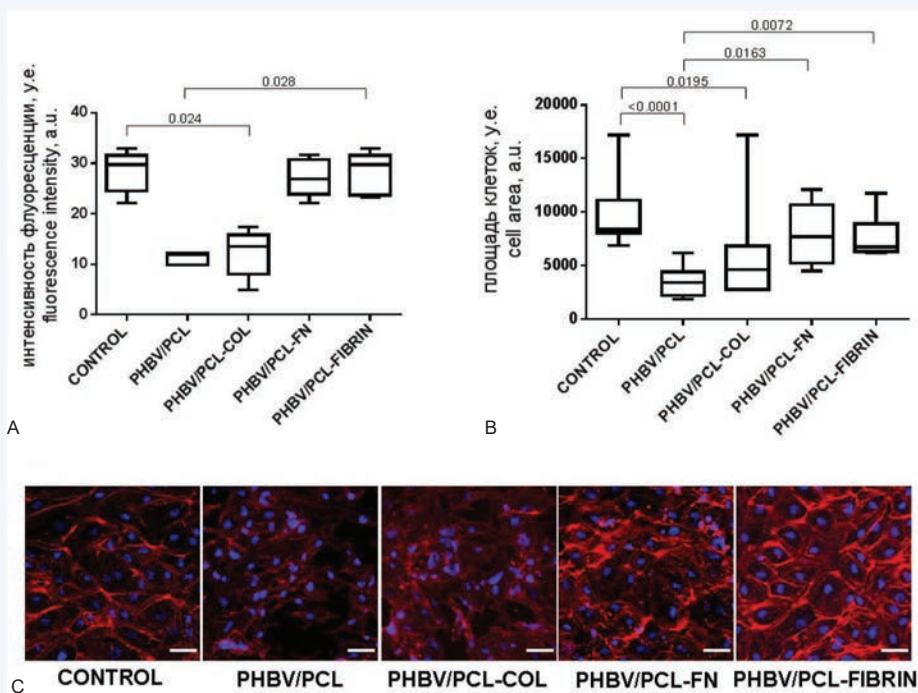


Рис. 3. Адгезия HUVEC на полимерных матрицах и культуральном пластике. А – интенсивность флуоресцентного сигнала F-актина, В – площадь клеток, С – конфокальная микроскопия, репрезентативные микрофотографии; масштабная линейка 50 мкм. На диаграмме представлены медианы, 25-й и 75-й процентиля, минимальные и максимальные значения показателя. Значения p приведены над скобками
Fig. 3. Adhesion of HUVEC on polymer matrices and culture plastic. A – fluorescence intensity of F-actin, B – cell area, C – Representative confocal microscopy images; scale bar = 50 μ m. The diagram shows medians, 25th and 75th percentiles, minimum and maximum values. The p values are given above the brackets

В качестве исследуемых показателей использовали интенсивность флуоресцентного сигнала, которая характеризовала выраженность в клетках актиновых филаментов, а также площадь клеток на матриксе, поскольку степень расплывчатости адгезионных клеток напрямую зависит от эффективности прикрепления к субстрату.

Было выявлено, что по количеству F-актина в клетке образцы групп PNBV/PCL-FN и PNBV/PCL-FIBRIN значительно превосходят остальные матриксы; при этом между этими группами отличий не наблюдали (рис. 3А).

По площади HUVEC в группах PNBV/PCL-FN и PNBV/PCL-FIBRIN также значительно превышали остальные группы, значимо ($p = 0,0001$) отличаясь от PNBV/PCL (7700 (5245;10675), 6760 (6315;8898) и 3427 (2198;4392) у.е. соответственно) (рис. 3В). В группе PNBV/PCL отмечали значительную гетерогенность в площади прикрепленных клеток, что в сочетании с общей неравномерностью распределения клеток по поверхности указывало на неэффективность покрытия. Аналогично, неравномерно распределялись клетки на поверхности матриксов PNBV/PCL (рис. 3С).

Коллаген является наиболее ранним и часто используемым биополимером в тканевой инженерии [11]. Столь широкое распространение в этих целях обусловлено его низкой иммуногенностью и хорошей биосовместимостью [12], а также способностью стимулировать клеточную адгезию [13]. Тем не менее в нашем исследовании из коллагена I типа не удалось сформировать эффективное адгезионное покрытие на поверхности полимерного матрикса. С учетом того, что способность коллагена I типа формировать субстрат с высокими адгезионными свойствами не вызывает сомнений, можно предположить, что в нашей работе не достигнуто достаточного связывания коллагеновой пленки с матриксом. Возможно, в этом случае требуется проведение дополнительной обработки для химической сшивки коллагена с полимером матрикса.

Фибриноген не обладает достаточными механическими свойствами, чтобы использовать его в качестве самостоятельного каркаса, однако он находит свое применение в тканевой инженерии как адгезирующее покрытие, так как несет на себе сайты клеточной адгезии [14]. В нашем исследовании фибриноген и фибрин успешно формировали фидерный слой на матриксах, значительно увеличивая адгезию эндотелиальных клеток, обеспечивая равномерное заселение клетками поверхности и формирование эндотелиального монослоя. Однако выживаемость клеток на PNBV/PCL-FN была несколько ниже, чем на PNBV/PCL-FIBRIN, что заставляет отдавать предпочтение именно фибриновому покрытию.

По популярности при использовании для нужд тканевой инженерии фибрин не уступает коллагену. Он также обладает высокой биосовместимостью и нетоксичностью [15]. Также его волокна содержат сайты клеточной адгезии [16], что обеспечивает способность поддерживать адгезию, пролиферацию и жизнеспособность клеток на поверхности. Кроме того, несомненным преимуществом фибринового покрытия тканеинженерных конструкций является его высокая доступность, поскольку фибрин можно получать из крови пациента, которому предназначен сосудистый протез, и таким образом полностью избежать иммунологических проблем, связанных с использованием чужеродного белка.

Заключение

По результатам проведенного исследования можно заключить, что модификация поверхности матриксов из PNBV/PCL фибрином, полученным из крови, позволяет значительно улучшить их адгезионные свойства. Модификацию фибрином можно использовать при разработке полимерных протезов сосудов малого диаметра.

Литература / References

- Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030442.
- Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The tissue-engineered vascular graft – past, present, and future. *Tissue Eng. Part. B.: Rev.* 2016;22(1):68–100. DOI: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
- Elliott M.B., Ginn B., Fukunishi T., Bedja D., Suresh A., Chen T. et al. Regenerative and durable small-diameter graft as an arterial conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(26):12710–12719. DOI: 10.1073/pnas.1905966116.
- Shoji T., Shinoka T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery. *Transl. Pediatr.* 2018;7(2):188–195. DOI: 10.21037/tp.2018.02.01.
- Abdulhannan P., Russell D.A., Homer-Vanniasinkam S. Peripheral arterial disease: a literature review. *Br. Med. Bull.* 2012;104:21–39. DOI: 10.1093/bmb/lds027.
- Ardila D.C., Liou J.J., Maestas D., Slepian M.J., Badowski M., Wagner W.R. et al. Surface Modification of Electrospun Scaffolds for Endothelialization of Tissue-Engineered Vascular Grafts Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Cells. *J. Clin. Med.* 2019;8(2):185. DOI: 10.3390/jcm8020185.
- Assmann A., Delfs C., Munakata H., Schiffer F., Horstkötter K., Huynh K. et al. Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials.* 2013;34:6015–6026. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.037.
- Conklin B.S., Wu H., Lin P.H., Lumsden A.B., Chen C. Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin-coated vascular graft. *Artif. Organs.* 2004;28:668–675. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2004.00062.x.
- Flameng W., De Visscher G., Mesure L., Hermans H., Jashari R., Meuris B. Coating with fibronectin and stromal cell-derived factor-1 α of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response-related degeneration. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014;147(4):1398–1404.e2. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.06.022.
- Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Глушкова Т.В., Матвеева В.Г. Создание персонализированного клеточно-заселенного сосудистого протеза *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(2):89–93. [Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Glushkova T.V., Matveeva V.G. Development of personalized cell-populated vascular graft in vitro. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(2):89–93. (In Russ.).] DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93.
- Copes F., Pien N., Vlierberghe S.V., Boccafocchi F., Mantovani D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:166. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00166.
- Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. Part B. Appl. Biomater.* 2004; 71:343–354. DOI: 10.1002/jbm.b.30096.
- Smethurst P.A., Onley D J., Jarvis G.E., O'Connor M.N., Knight C.G., Herr A. B. et al. Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J. Biol. Chem.* 2007;282(2):1296–1304. DOI: 10.1074/jbc.M606479200.
- Dietrich M., Heselhaus J., Wozniak J., Weinandy S., Mela P., Tschöcke B. et al. Fibrin-based tissue engineering: Comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. *Tissue Engineering. Part C: Methods.* 2013;19(3):216–226. DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0473.
- Park C.H., Woo K.M. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1064:253–261. DOI: 10.1007/978-981-13-0445-3_16.
- Podolnikova N.P., Yakovlev S., Yakubenko V.P., Wang X., Gorkun O.V., Ugarova T.P. The interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with fibrin occurs through multiple binding sites in the α_{IIb} β -propeller domain. *J. Biol. Chem.* 2014;289(4):2371–2383. DOI: 10.1074/jbc.M113.518126.

Информация о вкладе авторов

Великанова Е.А. – дизайн эксперимента, проведение экспериментов (иммунофлуоресцентный анализ), анализ результатов исследования, написание статьи, окончательное утверждение текста статьи.

Матвеева В.Г. – дизайн эксперимента, работа с клеточными культурами, проведение экспериментов (получение фибрина, МТТ-тест), анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

Сенокосова Е.А. – проведение экспериментов (флуоресцентный анализ), анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

Ханова М.Ю. – проведение экспериментов (флуоресцентный анализ), анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

Кривкина Е.О. – проведение экспериментов (изготовление полимерных матриц), окончательное утверждение текста статьи.

Антонова Л.В. – дизайн эксперимента, окончательное утверждение текста статьи.

Сведения об авторах

Великанова Елена Анатольевна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4146-3373.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

Сенокосова Евгения Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-9430-937X.

E-mail: sergea@kemcardio.ru.

Ханова Марьям Юрисовна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: hanomu@kemcardio.ru.

Кривкина Евгения Олеговна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Антонова Лариса Валерьевна, д-р мед. наук, заведующий лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antolv@kemcardio.ru.

 **Великанова Елена Анатольевна**, e-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Information on author contributions

Velikanova E.A. – study concept, the experiments performance (immunofluorescence analysis), study results analysis, writing and final approval of the manuscript for publication.

Matveeva V.G. – study concept, working with cell cultures, the experiments performance (obtaining fibrin, MTT-test), analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Senokosova E.A. – the experiments performance (fluorescence analysis), analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Khanova M.U. – performing the experiments (fluorescence analysis), analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Krivkina E.O. – the experiments performance (production of polymer matrices), and final approval of the manuscript for publication.

Antonova L.V. – study concept, and final approval of the manuscript for publication.

Information about the authors

Elena A. Velikanova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Vera G. Matveeva, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-4146-3373.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

Evgeniya A. Senokosova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-9430-937X.

E-mail: sergea@kemcardio.ru.

Mariam U. Khanova, Junior Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: hanomu@kemcardio.ru.

Evgeniya O. Krivkina, Junior Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Larisa V. Antonova, Dr. Sci. (Med.), Head, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antolv@kemcardio.ru.

 **Elena A. Velikanova**, e-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Received November 11, 2022

Поступила 11.11.2022



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-167-174>

УДК 615.277.3.065.099.031:678.043.52]-07-092.9:616.36:616.61

Сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений

М.А. Додохова¹, О.В. Воронова^{1,2}, И.М. Котиева¹, А.В. Сафроненко¹,
С.В. Шлык¹, Н.В. Дроботя¹, М.А. Акименко², Д.Б. Шпаковский³, Е.Р. Милаева³

¹ Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

² ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Ростов-на-Дону», 344011, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, ул. Варфоломеева, 92а

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Российская Федерация, Москва, ул. Ленинские Горы, 1–3

Аннотация

Введение. Оловоорганические соединения (ООС) являются перспективными кандидатами в противоопухолевые лекарственные средства (ЛС). Выявление патогенетических особенностей общетоксического действия гибридных оловоорганических соединений в период наибольшей выраженности клинической картины интоксикации позволит оценить риск развития гепато- и нефротоксических осложнений при введении *бис*(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Ме-3) и ((3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Ме-5) в качестве химиотерапевтических агентов.

Цель исследования: провести сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений Ме-3 и Ме-5 в максимально переносимой дозе (МПД) на 7-е сут развития токсического процесса.

Материал и методы. Гибридные оловоорганические соединения Ме-3 и Ме-5 вводили однократно внутрижелудочно крысам линии Wistar (самки) в МДП 2000 и 750 мг/кг соответственно. Биохимические и морфологические исследования были проведены на 7-е сут развития симптомов интоксикации по стандартным методикам.

Результаты. При введении Ме-3 и Ме-5 в печени выявлены признаки жировой дистрофии разной степени выраженности с преимущественным поражением центрлобулярных гепатоцитов, увеличение размера портальных трактов за счет отека и фиброза, скудной лимфоцитарной инфильтрацией. При введении Ме-5 морфологические изменения носили более тяжелый характер с вовлечением в процесс сосудистого русла органа. При введении тестируемых соединений в почках зафиксировано однотипное повреждение гломерулярного аппарата и почечных канальцев, характерное для токсической нефропатии. В группе неспецифических биохимических маркеров цитолиза выявлены однонаправленные изменения в крови опытных животных: умеренное снижение активности трансаминаз и увеличение активности креатинкиназы (КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и уровня креатинина. Процесс образования мочевины и синтеза белка функционально сохранен.

Выводы. На 7-е сут развития интоксикации при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений Ме-3 и Ме-5 в МПД биохимические и морфологические изменения в организме животных можно отнести к умеренной степени выраженности. Дальнейшее углубленное изучение Ме-3 и Ме-5 в качестве кандидатов в противоопухолевые средства является целесообразным.

Ключевые слова:	гибридные оловоорганические соединения, доклинические исследования, противоопухолевые лекарственные средства, гепатотоксичность, нефротоксичность.
Конфликт интересов:	авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Прозрачность финансовой деятельности:	работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-03-00471) и РНФ (грант № 22-63-00016, 22-23-00295).

✉ Додохова Маргарита Авдеевна, e-mail: dodohova@mail.ru.

Соответствие принципам этики:	исследование одобрено локальным независимым этическим комитетом Ростовского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 10/20 от 28.05.2020 г.).
Для цитирования:	Додохова М.А., Воронова О.В., Котиева И.М., Сафроненко А.В., Шлык С.В., Дроботья Н.В., Акименко М.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутриведении гибридных оловоорганических соединений. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):167–174. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-167-174 .

Comparative analysis of morphological and biochemical changes after a single intragastric administration of hybrid organotin compounds

Margarita A. Dodokhova¹, Olga V. Voronova^{1,2}, Inga M. Kotieva¹, Andrey V. Safronenko¹, Sergey V. Shlyk¹, Natalia V. Drobotya¹, Marina A. Akimenko², Dmitry B. Shpakovsky³, Elena R. Milaeva³

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Health-care of the Russian Federation,

29, Nakhichevan lane, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation

² Private Health Care Institution “Rostov-on-Don Clinical Hospital “Russian Railways-Medicine”,

92a, Varfolomeeva str., Rostov-on-Don, 344011, Russian Federation

³ Lomonosov Moscow State University,

1-3, Leninskie gory str., Moscow, 119991, Russian Federation

Abstract

Introduction. Organotin compounds are promising candidates for antitumor drugs. Identification of pathogenetic features of the general toxic effect of hybrid organotin compounds during the period of the greatest severity of the intoxication clinical picture will allow to estimate the risk of hepatotoxic and nephrotoxic complications with the administration of bis (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) dimethyltin (Me-3) and ((3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) triphenyltin (Me-5) as chemotherapeutic agents.

Aim: To conduct a comparative analysis of morphological and biochemical changes with a single intragastric administration of hybrid organotin compounds Me-3 and Me-5 in the maximum tolerated dose (MTD) on the 7th day of the toxic process development.

Material and Methods. Hybrid organotin compounds Me-3 and Me-5 were administered once intragastrically to Wistar rats (females) at a MTD of 2000 mg/kg and 750 mg/kg, respectively. Biochemical and morphological studies were carried out on the 7th day of the development of intoxication symptoms according to standard methods.

Results. With the introduction of Me-3 and Me-5 in the liver, signs of fatty dystrophy of varying severity were revealed, with a predominant lesion of centrilobular hepatocytes, an increase in the size of portal tracts due to edema and fibrosis, and scant lymphocytic infiltration. With the introduction of Me-5, morphological changes were more severe, with the involvement of the vascular bed of the organ in the process. When the tested compounds were administered in the kidneys, the same type of damage to the glomerular apparatus and renal tubules was recorded, characteristic of toxic nephropathy. Unidirectional changes in the blood of experimental animals were revealed in the group of nonspecific biochemical markers of cytolysis: a moderate decrease in transaminase activity and an increase in the activity of creatine kinase (CC), lactate dehydrogenase (LDH) and creatinine levels. The process of formation of urea and protein synthesis was functionally preserved.

Conclusion. On the 7th day of the development of intoxication with a single intragastric administration of hybrid organotin compounds Me-3 and Me-5 in the maximum tolerated doses, biochemical and morphological changes in the body of animals could be attributed to a moderate degree of severity.

Keywords:	hybrid organotin compounds, preclinical studies, anticancer drugs, hepatotoxicity, nephrotoxicity.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the work was supported by RFBR (grant No. 20-03-00471) and RHSF (grant No. 22-63-00016, 22-23-00295).

Adherence to ethical standards:	compliance with the principles of ethics. The study was approved by the local independent ethical Committee of the Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 10/20 of 28.05.2020).
For citation:	Dodokhova M.A., Voronova O.V., Kotieva I.M., Safronenko A.V., Shlyk S.V., Drobotya N.V., Akimenko M.A., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Comparative analysis of morphological and biochemical changes after a single intragastric administration of hybrid organotin compounds. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):167–174. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-167-174 .

Введение

Химиотерапия остается универсальным методом лечения и широко применяется в онкологии, но ее возможности ограничены высокой токсичностью лекарственных средств (ЛС). Прием цитотоксических препаратов сопровождается различными побочными эффектами, как правило, связанными с низкой селективностью и активной биотрансформацией соединений. Наиболее неблагоприятными реакциями при приеме противоопухолевых лекарственных препаратов (ЛП) являются лекарственно индуцированные поражения печени [1] и почек [2].

Разработка новых отечественных противоопухолевых и антиметастатических ЛП является приоритетной задачей для специалистов в области экспериментальной фармакологии и онкологии. Широкий спектр оловоорганических соединений (ООС) с различными органическими лигандами является перспективным направлением поиска кандидатов в противоопухолевые ЛС [3]. При направленной синтезе гибридных ООС *бис*(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me-3) и ((3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me-5) путем введения в их молекулы протекторного фрагмента 2,6-ди-*трет*-бутилфенола удалось существенно снизить общую токсичность [4] при сохранении противоопухолевой и антиметастатической активности на моделях экспериментальных неоплазий [5, 6].

Выявление патогенетических особенностей общетоксического действия гибридных ООС в период наибольшей выраженности клинической картины интоксикации (токсигенная стадия) позволит оценить риск развития

гепато- и нефротоксических осложнений при введении *бис*(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me-3) и ((3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me-5) в качестве химиотерапевтических агентов.

Токсический эффект необходимо оценивать с помощью определения функциональных и/или структурных изменений органов и систем [7].

Цель исследования: провести сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутриведении гибридных ООС *бис*(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me-3) и ((3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me-5) в максимально переносимой дозе (МПД) на 7-е сут развития токсического процесса.

Материал и методы

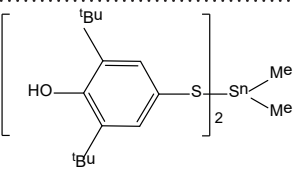
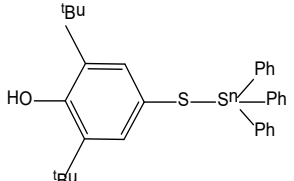
Тестируемые соединения

В ранее проведенных исследованиях из линейки гибридных ООС аналогичной структуры нами были отобраны вещества *бис*(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me-3) и ((3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me-5) по принципу наибольшей безопасности применения [4].

Строение и чистота Me-3 и Me-5 подтверждены данными элементного анализа и методами ядерного магнитного резонанса ^1H , ^{13}C . Их структурные формулы приведены в таблице 1.

Таблица 1. Структурные формулы исследуемых соединений

Table 1. Structural formulas of the studied compounds

Лабораторный шифр исследуемых соединений Laboratory cipher of the studied compounds	Структурная формула Structural formula	Международное название International name
Me-3		<i>бис</i> (3,5-ди- <i>трет</i> -бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова dimethyltin bis(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenylthiolate)
Me-5		((3,5-ди- <i>трет</i> -бутил-4-гидроксифенилтиолат)трифенилолова (3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenylthiolate) triphenyltin

Примечание: обозначение радикалов: Me – метил, ^tBu – трет-бутил, Ph – фенил.

Note: designation of radicals: Me – methyl, ^tBu – tert-butyl, Ph – phenyl.

Животные

Экспериментальное исследование было выполнено на 30 крысах линии Wistar (самки) (по 10 особей в каждой группе). Животные получены из питомника НИЦ «Курчатовский институт» – «ПЛЖ «Рапполово»» после адаптационного периода изолирования (14 сут); животные были стандартизированы по весу, рандомизированы с помощью метода случайных чисел. Все исследования выполнялись в соответствии с международными и российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных.

Дизайн исследования

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: группа А (контрольная) характеризовалась введением носителя – 1%-й раствор желатина; группа В (опыт Me-3) – суспензии Me-3 в 1%-м растворе желатина в МПД 2000 мг/кг; группа С (опыт Me-5) – суспензии Me-5 в 1%-м растворе желатина в МПД 750 мг/кг. Введение осуществляли однократно внутривенно. Для проведения экспериментальной части была выбрана МПД, то есть наибольшая доза, введение которой в организм не вызывает его гибели, но сопровождается развитием симптомов интоксикации. Срок наблюдения составил 7 сут, по истечении которого была произведена декапитация на гильотине [8], сбор туловищной крови и патологоанатомическое вскрытие проведены по известным методикам [9].

Оценку изменений при введении МПД тестируемых соединений производили биохимическими (неспецифические маркеры) и морфологическими (специфические маркеры) методами.

Для световой микроскопии образцы ткани органов (печень, почки) фиксировали 10%-м нейтральным формалином в буфере и заключали в парафин по классической методике. На ротационном микротоме из парафиновых блоков с образцами ткани изготавливали серийные срезы толщиной 3–5 мкм и наносили их на предметные стекла. Полученные срезы образцов ткани окрашивали гематоксилином-эозином по классическому протоколу. Микроскопию и фотофиксацию полученных гистологических препаратов осуществляли при 200-кратном увеличении с помощью светового микроскопа «LEICA DM4000B».

Для биохимической оценки функционально-метаболического состояния органов животного был проведен анализ изменения следующих показателей крови: общий белок, альбумин, мочевины, креатинина, общий и конъюгированный билирубин, активность ферментов (АсАт – аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1), АлАт – аланинаминотрансфераза (КФ 2.6.1.2), КК – креатинкиназа (КФ 2.7.3.2), ЛДГ – лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27), ЩФ – щелочная фосфатаза (КФ КФ 3.1.3.1)). Для определения был использован автоматический биохимический анализатор «ACCENT 300» и стандартные наборы фирмы «CORMAY» (Польша).

Для анализа результатов применяли описательную статистику. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета компьютерных программ версии STATISTICA 6.0. Нормальность распределения оценивали с помощью модифицированной версии метода Колмогорова – Смирнова, а именно по методике Андерсона – Дарлинга. Количественные показатели представлены средними значениями и стандартными ошибками. Оценку статистической значимости различий между количественными показателями в двух независи-

мых группах проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Сравнение показателей в трех независимых группах производили попарно.

Результаты и обсуждение

В формировании патологического процесса интоксикации особую значимость приобретает морфофункциональное состояние печени и почек в период выраженной клинической картины отравления как главных органов детоксикации и выведения ксенобиотиков. При срыве обезвреживающей и выводящей функции печени и почек может развиваться генерализованное воздействие экзогенных токсикантов и продуктов цитолиза на организм с дальнейшим развитием полиорганной недостаточности [9].

В доклинических исследованиях ЛП некропсия и последующее гистопатологическое изучение органов и тканей являются основными методами изучения токсичности, без которых невозможна адекватная оценка результатов эксперимента [10]. Макроскопическая картина печени и почек в опытных группах характеризовалась изменениями разной степени выраженности: общим венозным застоем, изменением цвета и консистенции органов, что позволило предположить развитие дистрофических и/или некротических процессов.

При гистологическом исследовании печени экспериментальных животных были получены следующие данные: при введении Me-3 отмечен незначительный отек, неравномерное полнокровие, гиалиново-капельная и очаговая мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов центральной части долек, портальные тракты обычных размеров, желчные протоки и вены триад с дистрофическими изменениями, очаговой десквамацией эпителия и эндотелия в их просвет с наличием скудных лимфоцитарных инфильтратов (рис. 1).

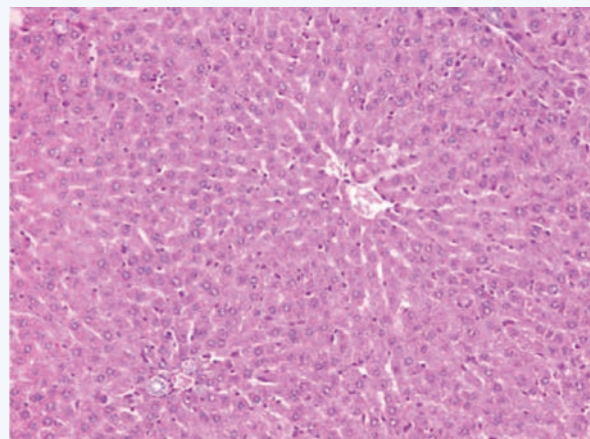


Рис. 1. Микроскопическая картина ткани печени при введении Me-3. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200
Fig. 1. Microscopic picture of the liver tissue after the introduction of Me-3. Stained with hematoxylin and eosin, magnification 200

При введении Me-5 выявлен резкий отек, эктазия синусоидных капилляров, пылевидная и мелкокапельная жировая дистрофия центральнобулярных гепатоцитов с локальными некрозами клеток, увеличение размера портальных трактов за счет отека и очагового фиброза, пролиферацией желчных протоков (рис. 2). В отличие от ги-

стопатологической картины в предыдущей опытной группе были выявлены более выраженные морфологические изменения в сосудах: сладж эритроцитов с тенденцией к тромбообразованию, неравномерная гиперплазия эндотелия с фокусами десквамации, периваскулярные экстравазаты в резко отечной парасосудистой зоне (см. рис. 2).

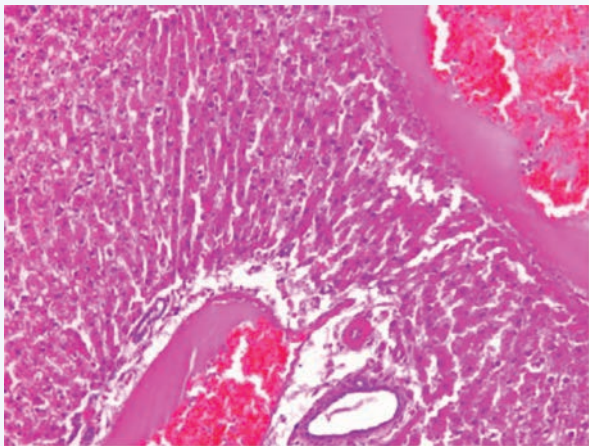


Рис. 2. Микроскопическая картина ткани печени при введении Ме-5. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200
Fig. 2. Microscopic picture of the liver tissue after the introduction of Me-5. Stained with hematoxylin and eosin, magnification 200

При введении тестируемых соединений зафиксировано однотипное повреждение гломерулярного аппарата и почечных канальцев, характерное для токсической нефропатии (рис. 3, 4): неравномерное полнокровие, гломерулы клеточные, местами коллабириваны, незначительный перигломерулярный отек, в интерстиции – отек, очаговые геморрагии, нефротелий канальцев набухший, местами десквамирован, в просвете части проксимальных канальцев – эозинофильный белковый субстрат. Ме-5 вызвал повреждения, сопровождающиеся более выраженными дистрофическими изменениями гломерулярного и канальцевого аппаратов почек с десквамацией нефротелия, субтотальными некрозами, кровоизлияниями (см. рис. 4).

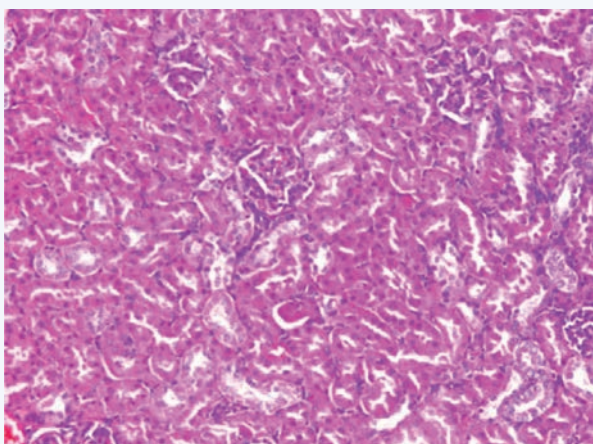


Рис. 3. Микроскопическая картина ткани почек при введении Ме-3. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200
Fig. 3. Microscopic picture of kidney tissue after the introduction of Me-3. Stained with hematoxylin and eosin, magnification 200

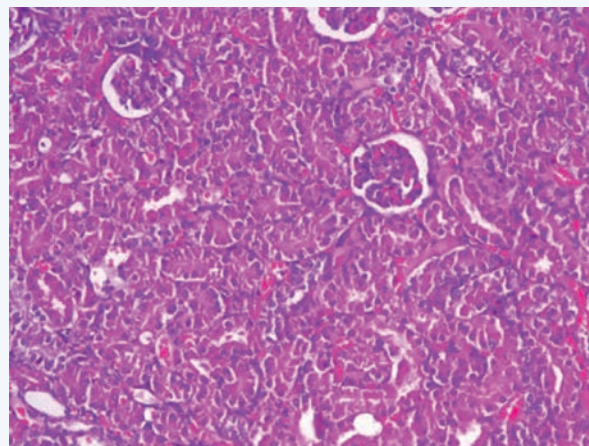


Рис. 4. Микроскопическая картина ткани почек при введении Ме-5. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200
Fig. 4. Microscopic picture of kidney tissue after the introduction of Me-5. Stained with hematoxylin and eosin, magnification 200

Полученные морфологические данные позволяют отнести гибридные ООС Ме-3 и Ме-5 к веществам, вызывающим неспецифическое поражение печени и почек. Цитолиз, типичный для острых специфических токсических поражений печени и почек, не выражен. На наш взгляд, клиническая картина интоксикации при введении Ме-3 и Ме-5 связана с нарушением проницаемости мембран клеток, возможным вторичным повреждением печеночной и почечной ткани протеолитическими ферментами.

Традиционно используемые методы определения в крови активности ряда индикаторных ферментов и низкомолекулярных соединений, обладающих относительной органоспецифичностью, таких как АлАт, АсАт, ЛДГ, ЩФ и др., обладают низкой специфичностью по отношению к заболеваниям печени и почек [10]. Данные маркеры были использованы в исследовании для определения общего токсического воздействия тестируемых гибридных ООС, а также в качестве косвенных маркеров функционального состояния исследуемых органов. Результаты биохимического исследования приведены в таблице 2.

Условно исследуемые биохимические маркеры можно разделить на 2 типа: 1) показатели цитолиза, 2) показатели биосинтетической функции печени и выделительной функции почек.

В группе неспецифических маркеров цитолиза выявлены однонаправленные изменения в крови опытных животных: умеренное снижение активности трансаминаз (для АлАт и АсАт соответственно: при введении Ме-3 – 17 и 15%, при введении Ме-5 – 21 и 24%) и увеличение активности КК (Ме-3 – 66%, Ме-5 – 148%), ЛДГ (Ме-3 – 89%, Ме-5 – 103,5%) и уровня креатинина (Ме-3 – 16%, Ме-5 – 40%).

Снижение активности АлАт и АсАт не характерно для развития токсического процесса и может быть связано с неконкурентным ингибированием ферментов трансаминирования в крови [11].

В группе показателей крови, характеризующих биосинтетическую функцию печени и выделительную функцию почек, выявлены следующие изменения: умеренное снижение общего белка (Ме-3 – 16%, Ме-5 – 18%), преимущественно за счет фракции альбуминов; увеличение уровня мочевины (Ме-3 – 77%, Ме-5 – 131,5%).

Таблица 2. Биохимические показатели крови животных на 7-е сут развития интоксикации ($M \pm m$, $p \leq 0,05$)

Table 2. Biochemical parameters of blood of animals on the 7th day of intoxication ($M \pm m$, $p \leq 0,05$)

Показатели Indicators	Группа А (контрольная) Group A (control)	Группа В (Ме-3) Group B (Me-3)	Группа С (Ме-5) Group C (Me-5)
Общий белок, г/л Total protein, g/l	78,3 ± 2,8	65,7 ± 4,7 ¹	64,0 ± 2,8 ¹
Альбумин, г/л Albumin, g/l	37,9 ± 1,4	29,7 ± 3,7 ¹	28,7 ± 3,5 ¹
Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/l	7,3 ± 0,7	12,9 ± 0,9 ^{1,2}	16,9 ± 1,4 ^{1,2}
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, mmol/l	39,2 ± 5,4	45,4 ± 6,8	54,6 ± 5,8 ¹
Общий билирубин, мкмоль/л Total bilirubin, mmol/l	1,12 ± 0,3	1,65 ± 0,6	1,81 ± 0,4
Конъюгированный билирубин, мкмоль/л Conjugated bilirubin, mmol/l	0,36 ± 0,11	0,81 ± 0,34 ¹	1,0 ± 0,4 ¹
АлАт, ед/л AlAt, ed/l	45,3 ± 5,2	37,5 ± 6,2	35,8 ± 5,6
АсАт, ед/л AsAt, ed/l	63,5 ± 4,0	54,9 ± 7,2	48,2 ± 10,0 ¹
ЛДГ, ед/л LDG, ed/l	696,6 ± 56,0	1313,9 ± 128,5 ¹	1417,1 ± 124,1 ¹
КК, ед/л KK, ed/l	2560,7 ± 394,0	4276,1 ± 719,4 ^{1,2}	6355,2 ± 634,6 ^{1,2}
ЩФ, ед/л SCHF, ed/l	355,8 ± 29,4	461,5 ± 76,6	479 ± 49,8

Примечание. $p < 0,05$ – различие статистически значимо с вероятностью 95% по отношению к контрольным значениям, X^1 – статистически значимые отличия по отношению к показателям в контрольной группе, X^2 – статистически значимые отличия в опытных группах между собой.

Note. $p < 0,05$ – in relation to the control values, the difference is statistically significant with a probability of 95%, X^1 - statistically significant differences in relation to the indicators in the control group, X^2 - statistically significant differences in the experimental groups among themselves.

Содержание альбуминов между опытными группами не имело достоверных отличий. Снижение уровня белков в плазме может быть связано прежде всего с уменьшением устойчивости белков крови при изменении их структуры, а также с прямым токсическим действием гибридных ООС на гелатоцит с уменьшением их синтеза и прямой потерей белков (нефротический синдром). Изменение белкового состава крови ведет к повышению концентрации токсических и биологически активных веществ в крови и затруднению процессов детоксикации [12]. В количественном отношении среди белков плазмы наиболее представлена фракция альбуминов, которая играет существенную роль в поддержании коллоидно-осмотического давления крови, транспорте липофильных веществ и служит для организма важным резервом аминокислот [13]. Повышение содержания токсических веществ в крови может отсроченно во времени спровоцировать запуск таких ключевых патогенетических механизмов повреждения печеночных и почечных структур, как цитолиз, воспаление, нарушения регенерации и метаболических процессов, окислительный стресс [14].

Умеренное повышение активности ЩФ и количества общего билирубина за счет обеих фракций (повышение среднего значения показателя прямого билирубина при введении Ме-3 составляет 49%; Ме-5 – 55,3%) свидетельствует о развитии нарушений пигментного обмена по типу паренхиматозной желтухи.

При анализе мочевинообразовательной функции печени было отмечено повышение среднего уровня мочевины в крови в опытных группах, что может быть связано

с одновременным увеличением распада белка из-за цитолиза и снижением обезвреживающей функции почек.

Установление степени и особенностей токсического повреждения печени и почек фармакологически активными веществами Ме-3 и Ме-5, близкими по химической структуре, выявило односторонние изменения биохимических и патоморфологических маркеров токсического повреждения при однократном внутривенном введении тестируемых соединений крысам линии Wistar (самкам).

Выводы

На 7-е сут развития интоксикации при однократном внутривенном введении гибридных ООС Ме-3 и Ме-5 в МПД биохимические и морфологические изменения в организме животных можно отнести к умеренной степени выраженности. Ввиду большой регенеративной способности печеночной и почечной ткани выявленные перестройки метаболизма, вероятно, потенциально обратимы. Процесс образования мочевины, синтеза белка и обезвреживания токсических веществ (образование прямого билирубина) функционально сохранен. Дальнейшее углубленное изучение Ме-3 и Ме-5 в качестве кандидатов в противоопухолевые средства является целесообразным.

Для повышения ценности доклинического исследования новых соединений с предполагаемым противоопухолевым действием необходимо рассматривать неспецифические биохимические маркеры токсического повреждения органов параллельно с морфологическим исследованием как ключевой метод доказательной медицины.

Литература / References

1. Azad A., Chang P., Devuni D., Bichoupan K., Kesar V., Branch A.D. et al. Real world experience of drug induced liver injury in patients undergoing chemotherapy. *J. Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;2(3):18. DOI: 10.21767/2575-7733.1000047.
2. Громова Е.Г., Бирюкова Л.С., Джумабаева Б.Т., Курмуков И.А. Практические рекомендации по коррекции нефротоксичности противоопухолевых препаратов. *Злокачественные опухоли.* 2020;10(3s2-2):118–130. [Gromova E.G., Biryukova L.S., Dzhumabaeva B.T., Kurmukov I.A. Practical recommendations for the correction of nephrotoxicity of anti-cancer drugs. *Malignant tumors.* 2020;10(3s2-2):118–130. (In Russ.)). DOI: 10.18027/12224-5057-2020-10-3s2-46.
3. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Сухорукова Н.В., Ганцгорн Е.В., Алхусейн-Кулягинова М.С. и др. Оценка фармакотерапевтического потенциала оловоорганических соединений *in vivo*. *Биофармацевтический журнал.* 2021;13(3):11–15. [Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Sukhorukova N.V., Gantsgorn E.V., Alkhusein-Kulyaginova M.S. et al. Evaluation of the pharmacotherapeutic potential of organotin compounds *in vivo*. *Biopharmaceutical Journal.* 2021;13(3):11–15. (In Russ.)). DOI: 10.30906/2073-8099-2021-13-3-11-15.
4. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Комарова Е.Ф., Трепель В.Г., Алхусейн-Кулягинова М.С. и др. Исследование острой пероральной токсичности оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-tert-бутилфенола. *Уральский медицинский журнал.* 2021;20(3):73–77. [Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Komarova E.F., Trepel V.G., Alkhusein-Kulyaginova M.S. et al. Study of acute oral toxicity of organotin compounds containing a fragment of 2,6-di-tert-butylphenol. *Ural Medical Journal.* 2021;20(3):73–77. (In Russ.)). DOI: 10.52420/2071-5943-2021-20-3-73-77.
5. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a b16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes. *Research Results in Pharmacology.* 2022;8(1):85–93. DOI: 10.3897/rrpharmacology.8.76363.
6. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma. *Research Results in Pharmacology.* 2021;7(4):81–88. DOI: 10.3897/rrpharmacology.7.71455.
7. Медицинская токсикология: национальное руководство / Под ред. Е.А. Лужникова. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014:928. Текст: электронный. [Medical toxicology: national guidelines / ed. by E. A. Luzhnikov. Moscow: GEOTAR-Media; 2014:928. Text: electronic. (In Russ.)). URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970429716.html> (14.12.2022).
8. Асташкин Е.И., Ачкасов Е.Е., Афонин К.В., Берзин И.А., Бескова Т.Б., Болотских Л.А. и др. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Москва; 2010:358. [Astashkin E.I., Achkasov E.E., Berzin I.A., Beskova T.B., Bolotskikh L.A., Boyarintsev V.V. et al. The guide to laboratory animals and alternative models in biomedical researches. Moscow; 2010:358. (In Russ.)).
9. Слуханчук Е.В., Бицадзе В.О., Тян А.Г., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Солопова А.Г. и др. Факторы риска тромбозов у онкологических больных. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2021;76(5):465–475. [Slukhanchuk E.V., Bitsadze V.O., Tyan A.G., Khizroeva D.Kh., Tretyakova M.V., Solopova A.G. et al. Risk factors for thrombosis in cancer patients. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2021;76(5):465–475. (In Russ.)). DOI: 10.15690/vramn1459.
10. Коптяева К.Е., Мужикян А.А., Гушин Я.А., Беляева Е.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). *Лабораторные животные для научных исследований.* 2018;2:71–92. [Koptayeva K.E., Muzhikyan A.A., Gushchin Ya.A., Belyaeva E.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Method of autopsy and extraction of organs of laboratory animals (rats). *Laboratory animals for scientific research.* 2018;2:71–92. (In Russ.)). DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-08.
11. Попов К.А., Цымбалюк И.Ю., Селишвили Р.И., Быков И.М., Устинова Е.С., Быков М.И. Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.* 2020;24(4):293–303. [Popov K.A., Tsybalyuk I.Yu., Sepiashvili R.I., Bykov I.M., Ustinova E.S., Bykov M.I. Selection of the optimal marker of acute liver injury in rats in the experiment. *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series: Medicine.* 2020;24(4):293–303. (In Russ.)). DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303.
12. Додохова М.А., Пионтник Е.А. Токсическое действие органических производных олова на активность ЩФ и трансаминаз в сыворотке крови человека. *Вестник РГМУ. Материалы IX Пироговской научной конференции.* М.; 2005:164. [Dodokhova M.A., Piontik E.A. Toxic effect of organotin compounds on the activity of alkaline phosphatase and transaminases in human serum. *Bulletin of Russian State Medical University. Materials of the IX Pirogov Scientific Conference.* Moscow; 2005:164. (In Russ.)).
13. Пашина Е.В., Золотавина М.Л. Комплекс биохимических показателей в оценке формирования стадий эндогенной интоксикации в клетке. *Современные проблемы науки и образования.* 2019;(6). Текст: электронный. [Pashina E.V., Zolotavina M.L. A complex of biochemical indicators in assessing the formation of stages of endogenous intoxication in the cell. *Modern problems of science and education.* 2019;(6). Text: electronic. (In Russ.)). URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29437> (14.12.2022).
14. Скворцов В.В., Бангаров Р.Ю., Скворцова Е.М. Нефротический синдром в работе врача общей практики. *Врач.* 2022;33(2):77–83. [Skvortsov V.V., Bangarov R.Yu., Skvortsova E.M. Nephrotic syndrome in the work of a general practitioner. *Doctor.* 2022;(2):77–83. (In Russ.)). DOI: 10.29296/25877305-2022-02-13.
15. Рогалева Е.В., Семенов М.П., Кузьмина Е.В., Абрамов А.А. Перспективы применения нового комплексного гепатопротекторного препарата на основе растительного компонента, содержащего флавоноиды. *Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии.* 2021;10(1):99–102. [Rogaleva E.V., Semenenko M.P., Kuzminova E.V., Abramov A.A. Prospects for the use of a new complex hepatoprotective drug based on a plant component containing flavonoids. *Collection of scientific papers of the Krasnodar Scientific Center for Animal Science and Veterinary Medicine.* 2021;10(1S):99–102. (In Russ.)). DOI: 10.48612/f3ta-58bz-13pu.

Информация о вкладе авторов

Котиева И.М., Шлык С.В., Милаева С.В. – концепция и дизайн исследования.

Додохова М.А., Воронова О.В., Акименко М.А., Сафроненко А.В., Шаповалов Д.Б. – сбор и статистическая обработка материала.

Додохова М.А., Котиева И.М. – написание текста.

Котиева И.М., Шлык С.В., Дробота Н.В. – редактирование.

Все авторы – утверждение окончательного варианта статьи.

Сведения об авторах

Додохова Маргарита Авдеевна, канд. мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3104-827X.

E-mail: dodohova@mail.ru.

Information on author contributions

Kotieva I.M., Shlyk S.V., Milaeva E.R. – the concept and design of the study.

Dodokhova M.A., Voronova O.V., Akimenko M.A., Safronenko A.V., Shpakovsky D.B. – collection and statistical processing of material.

Dodokhova M.A., Kotieva I.M. – writing the text.

Kotieva I.M., Shlyk S.V., Droboty N.V. – editing.

All authors – approval of the final version of the article

Information about the authors

Margarita A. Dodokhova, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-3104-827X.

E-mail: dodohova@mail.ru.

Воронова Ольга Владимировна, заведующий патологоанатомическим отделением, Клиническая больница «РЖД-Медицина», Ростов-на-Дону; ассистент кафедры судебной медицины, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-0542-6900.

E-mail: 9043401873@mail.ru.

Котиева Инга Мовлиевна, д-р мед. наук, профессор кафедры патологической физиологии, проректор по научной работе, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-2796-9466.

E-mail: kukulik70@mail.ru.

Сафроненко Андрей Владимирович, д-р мед. наук, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-4625-6186.

E-mail: andrejsaf@mail.ru.

Шлык Сергей Владимирович, д-р мед. наук, профессор, ректор Ростовского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-3070-8424.

E-mail: sshlyk@mail.ru.

Дроботья Наталья Викторовна д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой кардиологии, ревматологии и функциональной диагностики, проректор по учебной работе, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-6373-1615.

E-mail: drobotya@yandex.ru.

Акименко Марина Анатольевна, биолог высшей категории, патологоанатомическое отделение, Клиническая больница «РЖД-Медицина», Ростов-на-Дону, ассистент кафедры биологии, Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-8792-6911.

E-mail: akimenkoma@yandex.ru.

Шпаковский Дмитрий Борисович, канд. хим. наук, старший научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория биоэлементоорганической химии, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0002-7824-3382.

E-mail: dmsHPak@mail.ru.

Милаева Елена Рудольфовна, д-р хим. наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской химии и тонкого органического синтеза, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0002-5489-3866.

E-mail: helenamilaeva@mail.ru.

Додохова Маргарита Авдеевна, e-mail: dodohova@mail.ru.

Поступила 12.09.2022.

Olga V. Voronova, Head of the Pathological Department, Private Health Care Institution "Rostov-on-Don Clinical Hospital "Russian Railways-Medicine"; Assistant Professor, Department of Forensic Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-0542-6900.

E-mail: 9043401873@mail.ru.

Inga M. Kotieva, Dr. Sci. (Med.), Professor, Pathological Physiology Department, Vice-Rector for Scientific Work, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-2796-9466.

E-mail: kukulik70@mail.ru.

Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Head, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-4625-6186.

E-mail: andrejsaf@mail.ru.

Sergey V. Shlyk, Dr. Sci. (Med.), Professor, Rector, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-3070-8424.

E-mail: sshlyk@mail.ru.

Natalia V. Drobotya, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Cardiology, Rheumatology and Functional Diagnostics, Vice-Rector for Academic Affairs, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-6373-1615.

E-mail: drobotya@yandex.ru.

Marina A. Akimenko, Biologist of the Highest Category, Pathological department, Private Health Care Institution "Rostov-on-Don Clinical Hospital "Russian Railways-Medicine"; Assistant Professor, Department of Biology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0001-8792-6911.

E-mail: akimenkoma@yandex.ru.

Dmitry B. Shpakovsky, Cand. Sci. (Chem.), Senior Research Scientist, Bioelementoorganic Chemistry Research Laboratory, Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis, Faculty of Chemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-7824-3382.

E-mail: dmsHPak@mail.ru.

Elena R. Milaeva, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head, Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis, Faculty of Chemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-5489-3866.

E-mail: helenamilaeva@mail.ru.

Margarita A. Dodokhova, e-mail: dodohova@mail.ru.

Received September 12, 2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-175-180>
УДК 616-021.6:579.842.16]-085.28:547.853:616-092.9

Оценка противомикробной активности пиримидинового соединения 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в отношении *Klebsiella pneumoniae* в условиях *in vivo*

А.А. Цибизова¹, А.Л. Ясенявская¹, И.Н. Тюренков², А.А. Озеров²,
М.А. Самоотруева¹

¹ Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 414000, Российская Федерация, Астрахань, ул. Бакинская, 121

² Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Российская Федерация, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

Аннотация

Наибольшую опасность представляет развитие множественной антибактериальной резистентности у микроорганизмов, в том числе и *Klebsiella pneumoniae*, что актуализирует необходимость разработки и синтеза новых антимикробных соединений. Учитывая разностороннюю фармакологическую активность, соединения пиримидина стали предметом интереса для ученых в аспекте использования их как основы для новых противомикробных средств.

Цель: оценка противомикробной активности пиримидинового соединения 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в отношении *Kl. pneumoniae* в условиях *in vivo*.

Материал и методы. Оценку противомикробной активности в условиях *in vivo* соединения 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в отношении *Kl. pneumoniae* проводили, моделируя генерализованную инфекцию, путем интраперитонеального введения патогена в дозе 3×10^6 . Эксперимент проводили на мышах линии СВА (40 особей), разделенных на группы: контроль I – животные, получавшие интраперитонеально воду для инъекций; контроль II – инфицированные животные, которые не получали лечения; опытные группы – мыши с генерализованной инфекцией, которые получали в качестве лечения цефтриаксон в дозе 50 мг/кг интраперитонеально в течение 7 дней, и животные, получавшие исследуемое соединение в дозе 27 мг/кг на фоне инфекции в том же режиме. Противомикробную активность оценивали по следующим параметрам: выживаемость животных; индекс обсемененности внутренних органов и крови; общее количество лейкоцитов, С-реактивный белок и прокальцитонин.

Результаты. Установлено, что пиримидиновое производное 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он оказывает выраженную противомикробную активность в отношении *Kl. pneumoniae*, что проявляется в повышении выживаемости животных в условиях генерализованной клебсиеллезной инфекции, а также в снижении индекса обсемененности, общего количества лейкоцитов и уровней С-реактивного белка и прокальцитонина, что подтверждает снижение воспалительной реакции.

Выводы. Таким образом, производное пиримидина 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он проявляет противомикробную активность, сопоставимую с цефтриаксоном, в отношении *Klebsiella pneumoniae* в условиях экспериментальной генерализованной клебсиеллезной инфекции.

Ключевые слова:	производное пиримидина, антибактериальная резистентность, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , генерализованная инфекции, индекс обсемененности, С-реактивный белок, прокальцитонин.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Поиск и разработка перспективных соединений с антибактериальной активностью среди производных пиримидина для создания лекарственных препаратов» 48.2-2021.
Соответствие принципам этики:	все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/EU), правилами, принятыми «Международной конвенцией

по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986). Исследования одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации» (протокол № 6 от 27.11.2018 г.)

Для цитирования:

Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Тюренов И.Н., Озеров А.А., Самотруева М.А. Оценка противомикробной активности пиримидинового соединения 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в отношении *Klebsiella pneumoniae* в условиях *in vivo*. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2023;38(1):175–180. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-175-180>.

Evaluation of the antimicrobial activity of a pyrimidine compound 2-methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazolin-4(3H)-on against *Klebsiella pneumoniae* under *in vivo* conditions

Alexandra A. Tsibizova¹, Anna L. Yasenyavskaya¹, Ivan N. Tyurenkov²,
Alexandr A. Ozerov², Marina A. Samotrueva¹

¹ Astrakhan State Medical University,
121 Bakinskaya str., Astrakhan, 414000, Russian Federation

² Volgograd State Medical University,
1, Fallen Fighters sq., Volgograd, 400131, Russian Federation

Abstract

The greatest danger is the development of multiple antimicrobial resistance in microorganisms, including *Klebsiella pneumoniae*, which actualizes the necessity of development and synthesis of new antimicrobial compounds. Considering the versatile pharmacological activity, pyrimidine compounds became a subject of interest for scientists in the aspect of their use as a basis for new antimicrobial agents.

Aim: To assess the antimicrobial activity of the pyrimidine compound 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazoline-4(3H)-on against *Kl. pneumoniae* under *in vivo* conditions.

Material and Methods. The antimicrobial activity *in vivo* of the compound 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazolin-4(3H)-on against *Kl. pneumoniae* was performed simulating generalized infection by intraperitoneal injection of the pathogen at a dose of 3 × 10⁶. The experiment was conducted on CBA line mice (40 animals) divided into groups: control I – animals received intraperitoneal injection water; control II – infected animals received no treatment; experimental groups – mice with generalized infection treated with ceftriaxone at the dose 50 mg/kg intraperitoneally for 7 days, and the animals receiving the test compound at the dose 27 mg/kg against infection in the same mode. Antimicrobial activity was assessed by the following parameters: animal survival rate; internal organ and blood infestation index; total leukocyte count, C-reactive protein and procalcitonin.

Results. It was found that pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazoline-4(3H)-on has a marked antimicrobial activity against *Kl. pneumoniae* appeared in increase of animal survival in the conditions of generalized *Klebsiella* infection as well as in decrease of total leukocyte count, C-reactive protein and procalcitonin levels that confirms the reduction of the inflammatory reaction.

Conclusion. Thus, the pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazoline-4(3H)-on exhibits antimicrobial activity, comparable with ceftriaxone, against *Klebsiella pneumoniae* in experimental generalized *Klebsiella* infection.

Keywords: pyrimidine derivative, antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae*, generalized infection, index of infestation, C-reactive protein, procalcitonin.

Conflict of interest: the authors do not declare a conflict of interest.

Financial disclosure: the work was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation in terms of research on “Search and development of promising compounds with antibacterial activity among pyrimidine derivatives for the creation of drugs” 48.2-2021.

Adherence to ethical standards:	all animal manipulations were performed in accordance with the requirements of the Directive of the European Parliament and the Council of the European Union on the protection of the animals used for scientific purposes (2010/63/ EU), and the rules adopted by the International Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and scientific purposes (Strasbourg, 1986). The research was approved by the Ethical Committee of Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Astrakhan State Medical University" of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 6 of 27.11.2018).
For citation:	Tsibizova A.A., Yasenyavskaya A.L., Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Samotrueva M.A. Evaluation of the antimicrobial activity of a pyrimidine compound 2-methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl) quinazolin-4(3H)-on against <i>Klebsiella pneumoniae</i> under <i>in vivo</i> conditions. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):175–180. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-175-180 .

Введение

Устойчивость бактерий к противомикробным препаратам рассматривается на сегодняшний день как один из основных факторов, определяющих высокую заболеваемость и смертность от осложнений инфекционно-воспалительной патологии [1–3]. Наибольшую опасность представляет развитие множественной резистентности, которая развивается чаще у грамотрицательных микроорганизмов. *Klebsiella pneumoniae* является одним из этих организмов. Инфекции, вызванные *Kl. pneumoniae*, имеют широкое распространение среди новорожденных, пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом. Указанный микроорганизм занимает одно из лидирующих мест в этиологии не только внебольничных, но и внутрибольничных инфекций, включая пневмонию и сепсис [4]. Исследованиями установлено формирование устойчивости *Kl. pneumoniae* к антибиотикам пенициллинового и цефалоспоринового ряда, карбапенемам и аминогликозидам, а также фторхинолонам, что актуализирует необходимость разработки и синтеза новых антимикробных соединений [5]. Учитывая разностороннюю фармакологическую активность и разнообразные механизмы действия, многие гетероциклические соединения пиримидина стали предметом интереса для ученых в аспекте использования их как основы для новых лекарственных средств, в том числе и противомикробных [6, 7]. Кроме того, структура пиримидина является важной частью многих эндогенных веществ, что является преимуществом, позволяющим пиримидиновым производным взаимодействовать с генетическим материалом, ферментами и другими структурными единицами в клетке [8]. Исследователями был идентифицирован пиримидин в качестве метаболита клеточных процессов, таких как биосинтез клеточной стенки, клеточная проницаемость, репликация ДНК, биосинтез белка и др., у различных микроорганизмов, в том числе и *Kl. pneumoniae*, что может рассматриваться как один из основных аспектов механизма противомикробного действия пиримидиновых соединений [9, 10].

Цель исследования: оценка противомикробной активности пиримидинового соединения 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в отношении *Kl. pneumoniae* в условиях *in vivo*.

Материал и методы

Оценку противомикробной активности в условиях *in vivo* соединения 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он с лабораторным штаммом VMA-13-13 в

отношении *Kl. pneumoniae* осуществляли, моделируя генерализованную инфекцию. Эксперимент проводили на мышах линии СВА в количестве 40 особей, разделенных на четыре группы: контроль I – животные, получавшие интраперитонеально воду для инъекций в эквивалентном объеме; контроль II – инфицированные животные, которые не получали лечения после инфицирования; опытные группы – мыши с генерализованной инфекцией, которые получали в качестве лечения препарат сравнения цефтриаксон (порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения; ОАО «Биосинтез», Россия) в дозе 50 мг/кг интраперитонеально в течение 7 дней, и животные, получавшие исследуемое соединение в дозе 27 мг/кг (доза была выбрана после предварительных скрининговых исследований, где было установлено, что антибактериальная активность проявлялась в минимальной дозе, составляющей 1/10 от молекулярной массы соединения) на фоне инфекции в том же режиме. Генерализованную инфекцию моделировали путем интраперитонеального введения *Kl. pneumoniae* в дозе 3×10^6 в объеме 0,5 мл (доза была определена в предварительных исследованиях). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/EU), правилами, принятыми «Международной конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986). Исследования одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Астраханский Министерства здравоохранения Российской Федерации» (протокол № 6 от 27.11.2018 г.).

Противомикробную активность в отношении *Kl. pneumoniae* оценивали по следующим параметрам: выживаемость животных; индекс обсемененности крови, печени, селезенки и легких, также общее количество лейкоцитов, С-реактивный белок и прокальцитонин.

Нормальность распределения количественных признаков проверяли с использованием критерия Шапиро – Уилка. Количественные показатели описывали средними значениями (M) и стандартными ошибками среднего (m), в виде $M \pm m$. Категориальные показатели представлены абсолютными и относительными (в %) частотами. Различия количественных показателей в двух независимых группах оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез считали $p = 0,05$.

Результаты

Формирование генерализованной клебсиеллезной инфекции привело к гибели животных, в результате чего к 7-м сут эксперимента осталось 3 выживших особи в контроле II. В опытных группах, получавших соответственно цефтриаксон и VMA–13–13, в течение недели погибли по две особи (табл. 1).

При изучении микробной обсемененности крови и внутренних органов было установлено, что к группе контроля I не было выявлено *Kl. pneumoniae*; в контроле II

установлен характерный рост во всех образцах; у двух животных, получавших цефтриаксон была выявлена *K. pneumoniae* в печени и крови; при введении VMA–13–13 у двух особей в крови был отмечен характерный рост микроорганизма (табл. 2).

При расчете индекса обсемененности крови и внутренних органов (отношение положительных проб посева *Kl. pneumoniae* ко всем пробам) в условиях генерализованной клебсиеллезной инфекции при введении VMA–13–13 представлены в таблице 3.

Таблица 1. Влияние производного пиримидина 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он на выживаемость животных в условиях генерализованной клебсиеллезной инфекции

Table 1. Effect of the pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazolin-4(3H)-on on animal survival under conditions of generalized Klebsiella infection

Показатели Indicators Группы Groups	Выживаемость, % Survival rate, %						
	1-е сут day 1	2-е сут day 2	3-и сут day 3	4-е сут day 4	5-е сут day 5	6-е сут day 6	7-е сут day 7
Контроль I Control I	100	100	100	100	100	100	100
Контроль II, 3 × 10 ⁶ микробных тел Control II, 3 × 10 ⁶ microbial bodies	100	100	80	60	50	50	30
Цефтриаксон, 50 мг/кг Ceftriaxone, 50 mg/kg	100	100	100	100	100	90	80
VMA–13–13, 27 мг/кг VMA–13–13, 27 mg/kg	100	100	100	100	90	80	80

Таблица 2. Влияние производного пиримидина 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он на обсемененность внутренних органов и крови

Table 2. Effect of pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazolin-4(3H)-on on internal organ and blood infestation

Показатели Indicators Группы Groups	Количество особей Number of individuals	Печень Liver	Селезенка Spleen	Легкие Lungs	Кровь Blood
Контроль I Control I	10	–	–	–	–
Контроль II, 3 × 10 ⁶ микробных тел Control II, 3 × 10 ⁶ microbial bodies	3	+	+	+	+
Цефтриаксон, 50 мг/кг Ceftriaxone, 50 mg/kg	6	–	–	–	–
	2	+	–	–	+
VMA–13–13, 27 мг/кг VMA–13–13, 27 mg/kg	6	–	–	–	–
	3	–	–	–	+

Примечание: «+» – характерный рост *Kl. pneumoniae*, «–» – нет роста *Kl. pneumoniae*.

Note: “+” – characteristic growth of *Kl. pneumoniae*, “–” – no growth of *Kl. pneumoniae*.

Таблица 3. Влияние производного пиримидина 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он на индекс обсемененности крови и внутренних органов

Table 3. Effect of pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazolin-4(3H)-on on the blood and internal organ infestation index

Показатели Indicators Группы Groups	Печень Liver	Селезенка Spleen	Легкие Lungs	Кровь Blood
Контроль I Control I	0	0	0	0
Контроль II, 3 × 10 ⁶ микробных тел Control II, 3 × 10 ⁶ microbial bodies	1,0 ± 0,1**	1,0 ± 0,1**	1,0 ± 0,1**	1,0 ± 0,1**
Цефтриаксон, 50 мг/кг Ceftriaxone, 50 mg/kg	0,06 ± 0,01##	0	0	0,06 ± 0,01##
VMA–13–13, 27 мг/кг VMA–13–13, 27 mg/kg	0	0	0	0,08 ± 0,02##

Примечание: ** и ## – p < 0,01 по отношению к показателям группы контроля I и контроля II.

Note: ** and ## – p < 0.01 with respect to the parameters of control group I and control group II.

В контроле II моделирование генерализованной инфекции привело к статистически значимому росту индекса обсемененности в сравнении с контролем I. При введении цефтриаксона было отмечено снижение индекса в печени и крови в 16 раз ($p < 0,01$) в сравнении с контролем II; индекс обсемененности селезенки и легких достиг уровня контроля I. Введение соединения VMA-13-13 способствовало снижению данного показателя в крови в 12,5 раз ($p < 0,01$) по отношению к контролю II и во внутренних органах до уровня неинфицированной группы. При формировании генерализованной клебсиеллезной инфекции

наблюдались следующие изменения средних значений показателей: увеличение общего количества лейкоцитов в 3,8 ($p < 0,01$), уровня С-реактивного белка в 6 ($p < 0,01$) раз и прокальцитонина в 1,9 ($p < 0,05$) раза по отношению к интактной группе животных; введение препарата сравнения способствовало снижению изучаемых показателей в 1,4 ($p < 0,05$), 1,6 ($p < 0,01$) и 2 ($p > 0,05$) раза соответственно по отношению к инфицированной группе животных; исследуемое соединение привело к снижению показателей в 2,2 ($p < 0,01$), 2 ($p < 0,01$) и 1,9 ($p > 0,05$) раза соответственно в сравнении с контролем II (табл. 4).

Таблица 4. Влияние производного пиримидина 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он на общее количество лейкоцитов и маркеры генерализованной инфекции

Table 4. Effect of the pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoe hyl)quinazolin-4(3H)-on on total leukocyte count and markers of generalized infection

Показатели Indicators Группы Groups	Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/л$ Total leukocyte count, $\times 10^9/l$	С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/L	Прокальцитонин, нг/мл Procalcitonin, ng/ml
Контроль I Control I	7,18 \pm 1,02	18,61 \pm 1,20	1,86 \pm 0,08
Контроль II, 3×10^6 микробных тел Control II, 3×10^6 microbial bodies	27,37 \pm 2,56*	111,35 \pm 12,41**	3,63 \pm 0,97*
Цефтриаксон, 50 мг/кг Ceftriaxone, 50 mg/kg	18,91 \pm 2,45#	66,88 \pm 4,23##	1,65 \pm 0,98
VMA-13-13, 27 мг/кг VMA-13-13, 27 mg/kg	12,27 \pm 1,28##	55,38 \pm 4,01##	1,92 \pm 0,09

Примечание: * и # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы контроля I и контроля II, ** и ## – $p < 0,01$ по отношению к показателям группы контроля I и контроля II.

Note: * and # – $p < 0.05$ versus control I and control II, ** and ## – $p < 0.01$ versus control I and control II.

Обсуждение

Принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод, что пиримидиновое производное 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он под лабораторным шифром VMA-13-13 оказывает выраженную противомикробную активность в отношении *Kl. pneumoniae*, что проявляется в повышении выживаемости животных в условиях генерализованной клебсиеллезной инфекции, вызванной внутрибрюшинным введением штамма, выделенного от больных, страдающих хроническим бронхитом, в дозе 3×10^6 микробных тел, а также в снижении индекса обсемененности, общего количества лейкоцитов и уровней С-реактивного белка и прокальцитонина, что подтверждает снижение воспалительной реакции. Полученные результаты сопоставимы с результатами, полученными при введении животных в качестве лекарственного препарата цефтриаксона.

Полученные данные нашли подтверждение в результатах других исследований. Доказана противомикробная активность пирано[2,3-d]пиримидина, производных бензотиазолпиримидина, 7-(трифторметил)пиродо[2,3-d]пиримидиновых производных триазола, соединения имидазо[1, 2-a]пиримидина, производных тиазола[3,2-a]тиохромено[4,3-d]пиримидина в отношении *Kl. pneumoniae* [11–13]. Установлена противомикробная активность аналогов 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-a]пиримидина в отношении экспериментальной септической инфекции [14].

Выводы

Таким образом, производное пиримидина 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он проявляет противомикробную активность, сопоставимую с цефтриаксоном, в отношении *Klebsiella pneumoniae* в условиях экспериментальной генерализованной клебсиеллезной инфекции.

Литература / References

- Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 2021;10(10):1310. DOI: 10.3390/pathogens10101310.
- Peterson E., Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2928. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02928.
- Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*. 2018;11:1645. DOI: 10.2147/IDR.S173867.
- Khaertynov K.S., Anokhin V.A., Rizvanov A.A., Davidyuk Y.N., Semyonova D.R., Lubin S.A. et al. Virulence factors and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from neonates with sepsis. *Frontiers in Medicine*. 2018;5:225. DOI: 10.3389/fmed.2018.00225.
- Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L., Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020;17(17):6278. DOI: 10.3390/ijerph17176278.
- Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Тюренков И.Н., Озеров А.А., Башкина О.А., Самотруева М.А. Оценка противомикробной активности производного пиримидина в отношении *Staphylococcus aureus*. Антибиотики и химиотерапия. 2022;67(5–6):4–9. [Tsibizova A.A., Yasenyavskaya A.L., Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Bashkina O.A., Samotrueva M.A. Evaluation of the antimicrobial activity of pyrimidine derivative against *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics and chemotherapy*. 2022;67(5–6):4–9. (In Russ.). DOI: 10.37489/0235-2990-2022-67-5-6-4-9.

7. Ясенявская А.Л., Цибилова А.А., Озеров А.А., Тюренокв И.Н., Башкина О.А., Самотруева М.А. Оценка иммунотоксических свойств производных пиримидина. *Иммунология*. 2022;43(3):312–319. [Yasenyavskaya A.L., Tsibizova A.A., Ozerov A.A., Tyurenkov I.N., Bashkina O.A., Samotrueva M.A. Evaluation of immunotoxic properties of pyrimidine derivatives. *Immunology*. 2022;43(3):312–319. (In Russ.). DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-3-312-319.
8. Zhuang J., Ma S. Recent development of pyrimidine-containing antimicrobial agents. *Chem. Med. Chem.* 2020;15(20):1875–1886. DOI: 10.1002/cmcd.202000378.
9. Sayed M., Kamal El-Dean A.M., Ahmed M., Hassanien R. Design, synthesis, and characterization of novel pyrimidines bearing indole as antimicrobial agents. *J. Chin. Chem. Soc.* 2019;66(2):218–225. DOI: 10.1002/jccs.201800115.
10. Verma V., Joshi C. P., Agarwal A., Soni S., Kataria U. A review on pharmacological aspects of pyrimidine derivatives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020;10(5):358–361. DOI: 10.22270/jddt.v10i5.4295.
11. Bhat A. R., Dongre R. S., Almalki F. A., Berredjem M., Aissaoui M., Touzani R. et al. Synthesis, biological activity and POM/DFT/docking analyses of annulated pyrano [2, 3-d] pyrimidine derivatives: Identification of antibacterial and antitumor pharmacophore sites. *Bioorganic Chemistry*. 2021;106:104480. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104480.
12. Naresh Kumar R., Jitender Dev G., Ravikumar N., Krishna Swaroop D., Debanjan B., Bharath G. et al. Synthesis of novel triazole/isoxazole functionalized 7-(trifluoromethyl)pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives as promising anticancer and antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016;26(12):2927–2930. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.04.038.
13. Suresh L., Sagar Vijay Kumar P., Poornachandra Y., Ganesh Kumar C., Babu N. J., Chandramouli G.V.P. An expeditious four-component domino protocol for the synthesis of novel thiazolo[3,2-a]thiochromeno[4,3-d]pyrimidine derivatives as antibacterial and antibiofilm agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2016;24:3808–3817. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.025.
14. Savateev K.V., Ulomsky E.N., Fedotov V.V., Rusinov V.L., Sivak K.V., Lyubishin M.M. et al. 6-Nitrothiazolo[1,5-a]pyrimidines as promising structures for pharmacotherapy of septic conditions. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017;43:421–428. DOI: 10.1134/S1068162017040094.

Информация о вкладе авторов

Цибилова А.А. – сбор данных, оценка, обоснование и статистическая обработка полученных данных, подготовка черновика рукописи.

Ясенявская А.Л. – сбор данных, написание текста, анализ полученных результатов, подготовка черновика рукописи.

Тюренокв И.Н. – планирование исследования, редактирование рукописи, оценка полученных результатов.

Озеров А.А. – планирование исследования, редактирование рукописи, оценка полученных результатов.

Самотруева М.А. – разработка концепции и дизайна исследования, планирование исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.

Information on author contributions

Tsibizova A.A. – data collection, evaluation, justification and statistical processing of the obtained data, preparation of the draft manuscript.

Yasenyavskaya A.L. – data collection, text writing, analysis of the results obtained, preparation of the draft manuscript.

Tyurenkov I.N. – planning the study, editing the manuscript, evaluating the results.

Ozerov A.A. – research planning, manuscript editing, evaluation of the obtained results.

Samotrueva M.A. – development of research concept and design, research planning, critical intellectual content review, final approval of manuscript for publication.

Сведения об авторах

Цибилова Александра Александровна, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-9994-4751.

E-mail: sasha3633@yandex.ru.

Ясенявская Анна Леонидовна, канд. мед. наук, доцент, руководитель Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-2998-2864.

E-mail: yasen_9@mail.ru.

Тюренокв Иван Николаевич, д-р мед. наук, чл.-корр. РАН, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармации, Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования, Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-7574-3923.

E-mail: fi_bfuv@mail.ru.

Озеров Александр Александрович, д-р хим. наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-4721-0959.

E-mail: prof_ozerov@yahoo.com.

Самотруева Марина Александровна, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-5336-4455.

E-mail: ms1506@mail.ru.

Ясенявская Анна Леонидовна, e-mail: yasen_9@mail.ru.

Information about the authors

Alexandra A. Tsibizova, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor, Head of the Research Center; Associate Professor, Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology Chair, Astrakhan State Medical University. ORCID 0000-0002-9994-4751.

E-mail: sasha3633@yandex.ru.

Anna L. Yasenyavskaya, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Research Center; Associate Professor, Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology Chair, Astrakhan State Medical University. ORCID 0000-0003-2998-2864.

E-mail: yasen_9@mail.ru.

Ivan N. Tyurenkov, Dr. Sci. (Med.), Corresponding Member of RAS, Professor, Head of the Pharmacology and Pharmacy Chair, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education of the FAMT, Volgograd State Medical University. ORCID 0000-0001-7574-3923.

E-mail: fi_bfuv@mail.ru.

Alexander A. Ozerov, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Pharmaceutical and Toxicological Chemistry Chair, Volgograd State Medical University. ORCID 0000-0002-4721-0959.

E-mail: prof_ozerov@yahoo.com.

Marina A. Samotrueva, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology Chair, Astrakhan State Medical University. ORCID 0000-0001-5336-4455.

E-mail: ms1506@mail.ru.

Anna L. Yasenyavskaya, e-mail: yasen_9@mail.ru.

Received October 18, 2022

Поступила 18.10.2022

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-181-185>
УДК 614.2:616-08-039.57:614.253.4

Удовлетворенность качеством амбулаторно-поликлинической помощи студентов-медиков как элемент оценки действующей системы медицинского обслуживания

М.П. Чукреев, Д.Е. Калинин

Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

Аннотация

Введение. В данной статье рассмотрены проблемы качества оказания амбулаторно-поликлинической помощи студентам-медикам. Большая часть студентов предпочитают не обращаться за медицинской помощью специалистов даже в затруднительных ситуациях, а в большинстве случаев занимаются самолечением. Это вызвано недостаточно качественной степенью обслуживания амбулаторно-поликлинической службой прикрепленного контингента. Существующая государственная система оказания медицинской помощи не совершенна: отсутствует единый подход к организации студенческих поликлиник, в медицинских организациях не учитывается возрастная и социальная специфика учащихся, отмечается низкая преемственность в реабилитации и лечении пациентов, недостаточная профилактическая работа среди студенческой молодежи.

Цель исследования: определить уровень удовлетворенности качеством обеспечения медицинскими услугами студентов-медиков.

Материал и методы. Социологический метод включал в себя анкетирование студентов-медиков (1026 респондентов) по специально разработанному опроснику, который содержал вопросы об объеме, характере, качестве работы и удовлетворенности условиями поликлинического учреждения. Логистический метод заключался в анализе кадрового, ресурсного обеспечения, а также деятельности медицинского учреждения.

Результаты. Большая часть студентов-медиков встречаются с препятствиями организационного характера (запись на прием, очереди в регистратуру, ожидание очереди в дневной стационар, очереди на приеме и т. п.), 38,0% опрошенных респондентов отметили, что при появлении проблем со здоровьем им легче обратиться в медицинский кабинет колледжа, нежели к участковому врачу. Более того, 64,3% респондентов не имеют информацию об участковом враче. Удовлетворенность зависит от таких факторов, как время ожидания приема врача у кабинета ($p < 0,001$), доступность при записи на прием к врачу в поликлинику ($p < 0,001$), предпочтение при обращении к врачу при появлении проблем со здоровьем ($p < 0,001$), наличие трудностей организационного характера, чтобы попасть на прием или лечение в поликлинику ($p < 0,001$), расположение регистратуры и кабинетов специалистов, терминала для записи на прием ($p < 0,001$), а также условия пребывания в лечебно-профилактическом учреждении ($p < 0,001$).

Выводы. Выявлена необходимость внедрения в практику работы с контингентом студентов-медиков обратной связи, применения доступных скрининговых технологий по активному выявлению особо значимых факторов и групп риска наиболее распространенной патологии, принятия мер по уменьшению воздействия управляемых факторов, а также проведения ежегодных профилактических осмотров и диспансеризации.

Ключевые слова:	удовлетворенность качеством медицинской помощи, студенты-медики, амбулаторно-поликлиническая помощь.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование не имело спонсорской поддержки.
Для цитирования:	Чукреев М.П., Калинин Д.Е. Удовлетворенность качеством амбулаторно-поликлинической помощи студентов-медиков как элемент оценки действующей системы медицинского обслуживания. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):181–185. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-181-195 .

Satisfaction with the quality of outpatient care of medical students as an element of the assessment of the current system of medical care

Maxim P. Chukreyev, Dmitriy E. Kalinkin

Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
2, Moskovsky tr., Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Introduction. This article discusses the problems of the quality of outpatient care for medical students. Most of the students prefer not to seek medical help from specialists even in difficult situations, and in most cases they self-medicate. This is caused by an insufficient degree of quality service by the outpatient polyclinic service of the attached contingent. The existing state system of medical care is imperfect: there is no unified approach to the organization of student polyclinics; medical organizations do not take into account the age and social specifics of students; low continuity in the rehabilitation and treatment of patients; there is insufficient preventive work among students.

Aim: To determine the level of satisfaction with the quality of medical services provided to medical students.

Material and Methods. The sociological method included a survey of medical students (1026 respondents) according to a specially designed questionnaire that contained questions about the scope, nature, quality of work and satisfaction with the conditions of the polyclinic institution. The logistic method consisted in the analysis of personnel, resource provision, as well as the activities of the medical institution.

Results. Most of the medical students encounter organizational obstacles (appointment, waiting lists at the registry, waiting lists at the day hospital, waiting lists at the reception, etc.). 38.0% of respondents noted that when health problems appear, it is easier for them to go to the medical office of the college than to the district doctor. Moreover, 64.3% of respondents do not have information about the district doctor. Satisfaction depends on a number of factors such as: waiting time for a doctor's appointment at the office ($p < 0.001$), availability when making an appointment with a doctor at a polyclinic ($p < 0.001$), preference when contacting a doctor when health problems appear ($p < 0.001$), the presence of organizational difficulties to get an appointment or treatment in a polyclinic ($p < 0.001$), the location of the registry and specialist offices, the terminal for making an appointment ($p < 0.001$), as well as the conditions of stay in a medical facility ($p < 0.001$).

Conclusion. The necessity of introducing feedback into the practice of working with a contingent of medical students, using available screening technologies to actively identify the most significant factors and risk groups of the most common pathology, taking measures to reduce the impact of controlled factors, as well as annual preventive examinations and medical examinations has been identified.

Keywords:	satisfaction with the quality of medical care, medical students, outpatient care.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study had no sponsorship.
For citation:	Chukreyev M.P., Kalinkin D.E. Satisfaction with the quality of outpatient care of medical students as an element of the assessment of the current system of medical care. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):181–185. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-181-195 .

Введение

Системы здравоохранения и оказания медицинских услуг играют жизненно важную роль в защите и укреплении здоровья человека. Так, Всемирная организация здравоохранения обновила свой глобальный справочный список из 100 основных показателей здоровья в 2018 г., в котором удовлетворенность пациентов медицинскими услугами была представлена как главный показатель определения качества и безопасности медицинской помощи в различных системах здравоохранения [1].

Многогранность и специфичность категории студентов, относящаяся к определенному возрастному периоду, а также тесно связанная с определением «мо-

лодежь», доступны для изучения их характеристик, что определяет непосредственную актуальность для проведения ряда исследований в этой общественной группе [2]. Перегрузка учебными занятиями, нарушение распорядка дня, присутствие вредных привычек, нарушение пищевого поведения и статуса, а также санитарно-гигиенического режима – все эти факторы крайне неблагоприятно воздействуют на состояние здоровья студентов [3].

Студенты неестественно понимают проблемы своего здоровья, принимая различного рода нарушения за вариант нормы, либо игнорируют имеющиеся отклонения. Данное поведение может быть обусловлено недостаточным и/или неудовлетворительным уровнем обслу-

живания и предоставления амбулаторно-поликлинической службой медицинских услуг прикрепленному контингенту.

Исследование молодежи объясняется тем, что данная группа представляет собой общественно-политическое, интеллектуальное, общекультурное и репродуктивное звено общества [4]. Высокий уровень социальной активности непосредственно зависит от того, как общество и государство разработают и внедрят базовые условия для полноценной самореализации молодежи в социально-экономической и общественно-политической сферах жизни [5]. Кроме того, здоровье и благополучие детей и подростков составляют ядро того, что станет будущим человеческим капиталом общества и ресурсом для создания завтрашнего изобилия [6].

Медицинские организации здравоохранения сталкиваются с отсутствием общего, координированного и специфического подхода к структуре студенческих поликлиник. В медицинских организациях не принимаются во внимание индивидуальные социальные и возрастные особенности прикрепленных студентов, присутствует крайне низкая связь между лечением и реабилитацией пациентов, а также существует неудовлетворительная превентивная работа по хроническим неинфекционным заболеваниям среди студенческой молодежи [7]. Поэтому постоянное проведение мониторинга удовлетворенности качеством медицинских услуг и его тщательный анализ способствуют осуществлению четкого взаимодействия в системе «заказчик – производитель – потребитель медицинской помощи» [8].

Исследования удовлетворенности пациентов качеством медицинских услуг необходимы для оценки эффективности действующей системы здравоохранения, что помогает руководителям здравоохранения разрабатывать соответствующие стратегии, тем самым способствуя улучшению медицинского обслуживания [9].

Цель исследования: определение уровня удовлетворенности качеством обеспечения медицинскими услугами студентов-медиков, обучающихся в Высшем медицинском колледже «Авиценна» (г. Семей).

Материал и методы

Материал исследования представлял собой результаты анализа деятельности, а также показатели социологического опроса студентов-медиков, прикрепленных к МУ «Поликлиника № 6» (г. Семей). В анкетировании участвовали 1026 студентов-медиков (798 респондентов женского пола, 228 респондентов мужского пола), обучающихся в Высшем медицинском колледже «Авиценна». Средний возраст опрошенных респондентов составил 17,8 лет ($SD = 1,73$; диапазон от 15 до 32 лет).

В данной работе статистический анализ выполнялся с использованием таких программ, как StatTech v. 2.6.5 (разработчик – ООО «Статтех», Россия) и SPSS 22.0 версии. Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и долей. Производился расчет 95% доверительного интервала (ДИ) как для количественных, так и качественных переменных. Сравнение долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия χ^2 Пирсона. Оценка связи между признаками среди качественных данных осуществлялась с помощью коэффициента V Крамера.

Результаты

По результатам проведенного исследования было выявлено, что медиана возраста опрошенных студентов-медиков составила 18 лет (ДИ 95% [16; 20] лет). Доля медицинских студентов мужского пола составила 22,2% (ДИ 95% [20,9; 23,5]%), а женского – 77,8% (ДИ 95% [76,5; 79,1]%).

Нами был проведен анализ оценки состояния собственного здоровья на момент анкетирования в зависимости от пола опрошенных студентов-медиков. Так, 36,1% (ДИ 95% [34,6; 37,6]%) студентов-медиков указали на «отличное состояние своего здоровья», 21,8% (ДИ 95% [20,5; 23,1]%) – «хорошее», 33,0% (ДИ 95% [31,5; 34,5]%) – «удовлетворительное», 9,1% (ДИ 95% [8,2; 10,0]%) – «неудовлетворительное». Установлены статистически значимые различия между мужским и женским полом по оценке состояния своего здоровья ($\chi^2 = 18,511$; $df = 3$; $p < 0,001$).

Большое внимание уделяется доверию при обращении к какому-либо врачу. Так, при появлении расстройств со здоровьем 38,0% (ДИ 95% [35,0; 41,0]%) респондентов легче обратиться в медицинский кабинет колледжа, 41,9% (ДИ 95% [38,9; 44,9]%) – в МУ «Поликлиника № 6», 20,1% (ДИ 95% [17,6; 22,6,]%) ни к кому не обратятся, а приступят к самолечению. Более того, 64,3% (ДИ 95% [61,4; 67,2]%) респондентов не знают своего участкового врача МУ «Поликлиника № 6». 19,2% (ДИ 95% [18,0; 20,4]%) студентов-медиков указали на значительные препятствия к получению медицинских услуг. Нами была выявлена статистически значимая связь умеренной силы между удовлетворенностью качеством медицинского сервиса и обращением к врачу за помощью ($V = 0,31$; $p < 0,001$).

Также было установлено, что 34,3% (ДИ 95% [31,4; 37,2]%) респондентов обращаются к врачу всегда, когда чувствуют себя больными, 13,8% (ДИ 95% [11,7; 15,9]%) – когда им необходимо освобождение от учебы, 44,2% (ДИ 95% [41,2; 47,2]%) – когда чувствуют, что без медицинской помощи им уже не обойтись, и всего 7,7% (ДИ 95% [6,1; 9,3]%) респондентов к врачам не обращаются.

В таблице представлено распределение респондентов по удовлетворенности условиями оказания медицинской помощи и наличию рекомендации МУ «Поликлиника № 6» своим друзьям и родственникам. Что касается рекомендации, то 41,7% (ДИ 95% [40,2; 43,2]%) респондентов ответили «да», 37,9% (ДИ 95% [36,4; 39,4]%) – «нет», а 20,4% (ДИ 95% [19,1; 21,7]%) затруднились ответить. Согласно представленной таблице, при оценке рекомендации МУ «Поликлиника № 6» своим друзьям и родственникам в зависимости от удовлетворенности условиями оказания медицинской помощи в поликлинике нами были установлены статистически значимые различия ($p < 0,001$). Причем наблюдается умеренная связь между удовлетворенностью условиями оказания медицинской помощи в поликлинике и желанием рекомендовать данную поликлинику ($V = 0,46$; $p < 0,001$).

Важную роль в удовлетворенности работой организации здравоохранения играет ожидание, а также своевременность получения медицинской помощи. Так, по результатам опроса студентов-медиков выяснилось, что всего лишь 8,7% (ДИ 95% [7,0; 10,4]%) респондентов очень легко удастся записаться на прием к врачу в поликлинике.

Таблица. Распределение респондентов по удовлетворенности условиями оказания медицинской помощи и наличию рекомендации МУ «Поликлиника № 6» своим друзьям и родственникам

Table. Distribution of respondents by satisfaction with the conditions of medical care and the availability of recommendations of the medical institution "Polyclinic No.6" to friends and relatives

Удовлетворенность условиями оказания медицинской помощи в поликлинике Satisfaction with the conditions of medical care in the polyclinic	Рекомендация МУ «Поликлиника № 6» своим друзьям и родственникам Recommendation of the medical institution "Polyclinic No. 6" to friends and relatives			Всего Total	p
	Да Yes	Нет No	Затруднились ответить Found it difficult to answer		
Да, полностью Yes, completely	183	17	16	216 (21,0%)	< 0,001*
Больше да, чем нет More yes than no	118	59	69	246 (23,9%)	
Больше нет, чем да More no than yes	117	191	58	366 (35,7%)	
Не удовлетворен Not satisfied	1	98	14	113 (11,0%)	
Затруднились ответить Found it difficult to answer	9	24	52	85 (8,4%)	
Всего Total	428 (41,7%)	389 (37,9%)	209 (20,4%)	1026 (100%)	

Обсуждение

Важными компонентами эффективной деятельности поликлиники являются разработка и реализация административно-управленческих распоряжений, предст-авленных в форме методических указаний и практико-ориентированных рекомендаций, которые направлены на грамотное распределение прикрепленного контингента населения по различным направлениям врачебных специальностей благодаря отлаженной работе регистратуры, доврачебного кабинета, а также кабинетов врачей общей практики. Систематический обзор, проведенный в 2017 г. на основе международных данных, показал, что небольшое время ожидания положительно влияет на удовлетворенность пациентов [10]. Так, в нашем исследовании выяснилось, что 27,2% (ДИ 95% [24,5; 29,9]%) опрошенных студентов-медиков проводят в ожидании на прием к врачу у кабинета в среднем от 15 до 30 мин, 24,7% (ДИ 95% [22,1; 27,3]%) – от 30 до 60 мин.

В настоящее время неотъемлемой частью повышения качества медицинского сервиса и удовлетворенности получением медицинской помощи является тщательное изучение мнения каждого пациента, которое может выступать в роли определителя комплексной оценки различных показателей деятельности учреждения здравоохранения. Удовлетворенность пациентов медицинскими услугами включают в себя такие индикаторы, как удовлетворенность качеством и объемом медицинских услуг, обеспеченность лекарственными средствами, пациент-ориентированность [11]. В результате анализа таблиц сопряженности с помощью критерия χ^2 Пирсона было выявлено, что на удовлетворенность влияют такие факторы, как время ожидания приема врача у кабинета ($p < 0,001$), доступность при записи на прием к врачу в поликлинику ($p < 0,001$), предпочтение при обращении к врачу при появлении проблем со здоровьем ($p < 0,001$), наличие трудностей организационного характера, чтобы попасть на прием или лечение в МУ «Поликлиника № 6» ($p < 0,001$), расположение регистратуры и кабинетов специалистов, терминала для записи на прием ($p < 0,001$), а также усло-

вия пребывания в лечебно-профилактическом учреждении ($p < 0,001$) [12].

Для получения развернутой картины оценки действующей амбулаторно-поликлинической системы обслуживания прикрепленных студентов-медиков дополнительно можно было бы провести анализ показателей деятельности МУ «Поликлиника № 6». Но в связи с переходом всех обслуживающих поликлиник на комплексную медицинскую информационную систему Damumed использование и обработка конкретных статистических данных именно по контингенту прикрепленных студентов-медиков Высшего медицинского колледжа «Авиценна» вызывает трудности, так как данная система технически не способна разделить контингент учащихся на необходимые категории для анализа показателей деятельности МУ «Поликлиника № 6».

Выводы

В результате данного исследования установлена средняя степень удовлетворенности качеством оказания амбулаторно-поликлинической помощи. Более того, проведенный анализ выявил присутствие ряда негативных факторов в организации предоставления поликлинической помощи, что может послужить для руководства МУ «Поликлиника № 6» основанием для проведения мероприятий по устранению проблем, а также для стратегического планирования по управлению рисками.

Необходима разработка программы последовательной и поэтапной реорганизации механизмов амбулаторно-поликлинического процесса с применением инновационной формы предоставления медицинских услуг, которая подразумевает получение обратной связи от студентов-медиков, прикрепленных к МУ «Поликлиника № 6»; а также использование доступных скрининговых технологий, выявляющих группы риска среди лиц с наиболее распространенными патологиями; проведение ежегодных профилактических осмотров, диспансеризации и других лечебно-профилактических мер.

Литература / References

- World Health Organization. 2018 Global Reference list of 100 Core Health Indicators (Plus Health-Related SDGs). Geneva, Switzerland; 2018:136. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259951/> (08.12.2022).
- Латинова Н.М. Место и роль молодежи в современном узбекистанском обществе. *Acad. Res. Educ. Sci.* 2020;3:93–109. [Latynova N.M. The place and role of youth in modern Uzbek society. *Acad. Res. Educ. Sci.* 2020;3:93–109. (In Russ.)].
- Мелихова Е.П., Натарава А.А., Васильева М.В. Гигиеническая оценка фактического питания студентов медицинского вуза. *Символ науки.* 2016;67(3–2):178–179. [Melikhova E.P., Natarova A.A., Vasilyeva M.V. Hygienic assessment of the actual nutrition of medical university students. *Symbol of Science.* 2016;67(3–2):178–179. (In Russ.)]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/gigienicheskaya-otsenka-fakticheskogo-pitaniya-studentov-meditsinskogo-vuza> (08.12.2022).
- Бондарев В.Г., Башмакова Н.И., Снина А.И., Цыплакова Е.П. Социальное здоровье современной молодежи как приоритет социальной политики государства. *Общество: политика, экономика, право.* 2020;82(5):13–20. [Bondarev V.G., Bashmakova N.I., Sinina A.I., Tsyplakova E.P. Social health of modern youth as a priority of the social policy of the state. *Society: politics, economics, law.* 2020;82(5):13–20. (In Russ.)]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sotsialnoe-zdorovie-sovremennoy-molodezhi-kak-prioritet-sotsialnoy-politiki-gosudarstva> (08.12.2022).
- Полтавская М.Б. Формы социальной активности молодежи и старшего поколения (по материалам исследования жителей волгограда). *Известия Тульского государственного университета.* 2019;7(1):98–110. [Poltavskaya M.B. Forms of social activity of youth and older generation. *Proceedings of Tula State University.* 2019;7(1):98–110. (In Russ.)]. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41522513> (08.12.2022).
- Alfvén T., Dahlstrand J., Humphreys D., Helldén D., Hammarstrand S., Hollander A.C. et al. Placing children and adolescents at the centre of the Sustainable Development Goals will deliver for current and future generations. *Glob. Health Action.* 2019;12(1):1670015. DOI: 10.1080/16549716.2019.1670015.
- Попова Н.М., Рапенкова А.В., Москвина Ю.В., Геворкян А.Г. Оценка качества и доступности медицинской помощи студентами медицинского вуза. *Скиф. Вопросы студенческой науки.* 2019;39(11):308–313. [Popova N.M. Evaluation of the quality and accessibility of medical care by medical university students. *Skiff Issues of Student's Science.* 2019;39(11):308–313. (In Russ.)]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-kachestva-i-dostupnosti-meditsinskoy-pomoschi-studentami-meditsinskogo-vuza> (08.12.2022).
- Ерохина И.Ю., Рослая Н.А. Анализ удовлетворенности качеством предоставления медицинских услуг в амбулаторных условиях. *Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения.* IV Международная (74-я Всероссийская) научно-практическая конференция. 2019:626–631. [Erokhina I.Yu., Roslaya N.A. Analysis of satisfaction with the quality of medical services provided in outpatient settings. *Topical Issues of Modern Medical Science and Healthcare. IV International (74 All-Russian) Scientific and Practical Conference.* 2019:626–631. (In Russ.)]. URL: http://elib.usma.ru/bitstream/usma/4748/1/USMU_Sbornik_statei_2019_3_154.f (08.12.2022).
- Shumba C.S., Kabali K., Miyonga J., Mugadu J., Lakidi L., Kerchan P., Tumwesigye T. Client satisfaction in a faith-based health network: Findings from a survey in Uganda. *Afr. Health Sci.* 2017;17(3):942–953. DOI: 10.4314/ahs.v17i3.38.
- Batbaatar E., Dorjdagva J., Luvsannyam A., Savino M.M., Amenta P. Determinants of patient satisfaction: a systematic review. *Perspect. Public Health.* 2017;137(2):89–101. DOI: 10.1177/17579139166634136.
- Аксенова Е.И., Бессчетнова О.В. Показатели доступности и качества медицинской помощи, обеспечивающие удовлетворенность населения медицинской помощью в различных странах мира. Экспертный обзор. М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ»; 2021:40. [Aksenova E.I., Besschetnova O.V. Indicators of accessibility and quality of medical care, ensuring the satisfaction of the population with medical care in various countries of the world. Expert review. Moscow: GBU NIIOZMM DZM; 2021:40. (In Russ.)]. URL: <https://niioz.ru/upload/iblock/63d/63d12bf7dd923bd9c2a1870502c07175.pdf> (08.12.2022).
- Чукреев М.П., Калинин Д.Е. Оценка удовлетворенности качеством амбулаторно-поликлинического обслуживания студентов-медиков. Материалы 69-й Всероссийской научной конференции молодых ученых и студентов с международным участием. 2021;061(69):303–304. [Chukreev M.P., Kalinkin D.E. Assessment of satisfaction with the quality of outpatient services for medical students. Materials of the 69th All-Russian Scientific Conference of Young Scientists and Students with international participation. 2021;061(69):303–304. (In Russ.)].

Информация о вкладе авторов

Чукреев М.П. – создание основной концепции и написание текста статьи.

Чукреев М.П., Калинин Д.Е. – сбор информации, редакционная и научная правка.

Все авторы ознакомлены со статьей и согласны с ее опубликованием.

Information on author contributions

Chukreyev M.P. – creation of the main concept and writing the text of the article.

Chukreyev M.P., Kalinkin D.E. – collection of information, editing and scientific revision of the manuscript

All authors are familiar with the article and agree to its publication

Сведения об авторах

Чукреев Максим Павлович, аспирант, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-1993-7533.

E-mail: maksim7753191@mail.ru.

Калинкин Дмитрий Евгеньевич, д-р мед. наук, доцент, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-6948-6075.

E-mail: kalinkin750@gmail.com.

Чукреев Максим Павлович, e-mail: maksim7753191@mail.ru.

Information about the authors

Maxim P. Chukreyev, Graduate Student, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0003-1993-7533.

E-mail: maksim7753191@mail.ru.

Dmitry E. Kalinkin, Dr. Sci. (Med.), Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID 0000-0002-6948-6075.

E-mail: maksim7753191@mail.ru.

Maxim P. Chukreyev, e-mail: maksim7753191@mail.ru.

Поступила 26.04.2022

Received April 26, 2022

Российская Академия Наук
Томский национальный исследовательский медицинский центр
Научно-исследовательский институт кардиологии
Российское кардиологическое общество

Всероссийское научное общество специалистов по клинической электрофизиологии и кардиостимуляции
Национальный исследовательский Томский государственный университет



ЧЕТВЕРТЫЙ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ФОРУМ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

КАРДИОЛОГИЯ XXI ВЕКА: АЛЬЯНСЫ И ПОТЕНЦИАЛ

СОВМЕСТНО С

XIV научно-практической конференцией с международным участием

«КЛИНИЧЕСКАЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ И ИНТЕРВЕНЦИОННАЯ
АРИТМОЛОГИЯ»

XXII научно-практическим семинаром молодых ученых

«АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ КАРДИОЛОГИИ»



Регистрация участников: portal.cardio-tomsk.ru

ТОМСК
26-28 апреля 2023 г.

ГЛУБОКОУВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ! ДОРОГИЕ ДРУЗЬЯ!

Приглашаем вас принять участие в работе **Четвертого Всероссийского научно-образовательного форума** с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал», который пройдет **26-28 апреля 2023 г.**

Формат проведения Форума комбинированный (26 апреля – очный с онлайн-трансляцией, 27 и 28 апреля – онлайн).

Форум запланирован как мультидисциплинарное мероприятие, направленное на обмен передовыми научными знаниями и практическим опытом в области эпидемиологии, профилактики, диагностики, терапевтического и хирургического лечения широкого спектра заболеваний сердечно-сосудистой системы и коморбидной патологии, а также реабилитации пациентов с данными проблемами.

Приглашаются к участию российские и зарубежные ученые, профессорско-преподавательский состав и студенты старших курсов медицинских ВУЗов, практикующие врачи, молодые исследователи, аспиранты, учебные ординаторы и другие заинтересованные специалисты, работающие в области кардиологии, кардиохирургии, фундаментальной медицины, рентгенэндоваскулярной диагностики и лечения, лучевой диагностики и смежных дисциплин.

Официальные языки форума – русский, английский.

ТЕМАТИЧЕСКИЕ ФОКУСЫ ФОРУМА:

КАРДИОИНТЕРВЕНЦИЯ

(26 апреля 2023 г., очный формат с онлайн-трансляцией):

прогресс в интервенционном лечении сердечно-сосудистой патологии – лечение сложных нарушений ритма сердца, рентген-эндоваскулярные диагностика и лечение в кардиологии

КАРДИОИНТЕГРАЦИЯ

(27-28 апреля 2023 г., формат онлайн):

проблемы коморбидности и полипрагмазии в кардиологии; междисциплинарные взаимодействия и подходы к эффективному управлению сердечно-сосудистой патологией в условиях коморбидности; мультидисциплинарный подход в формате Heart Team

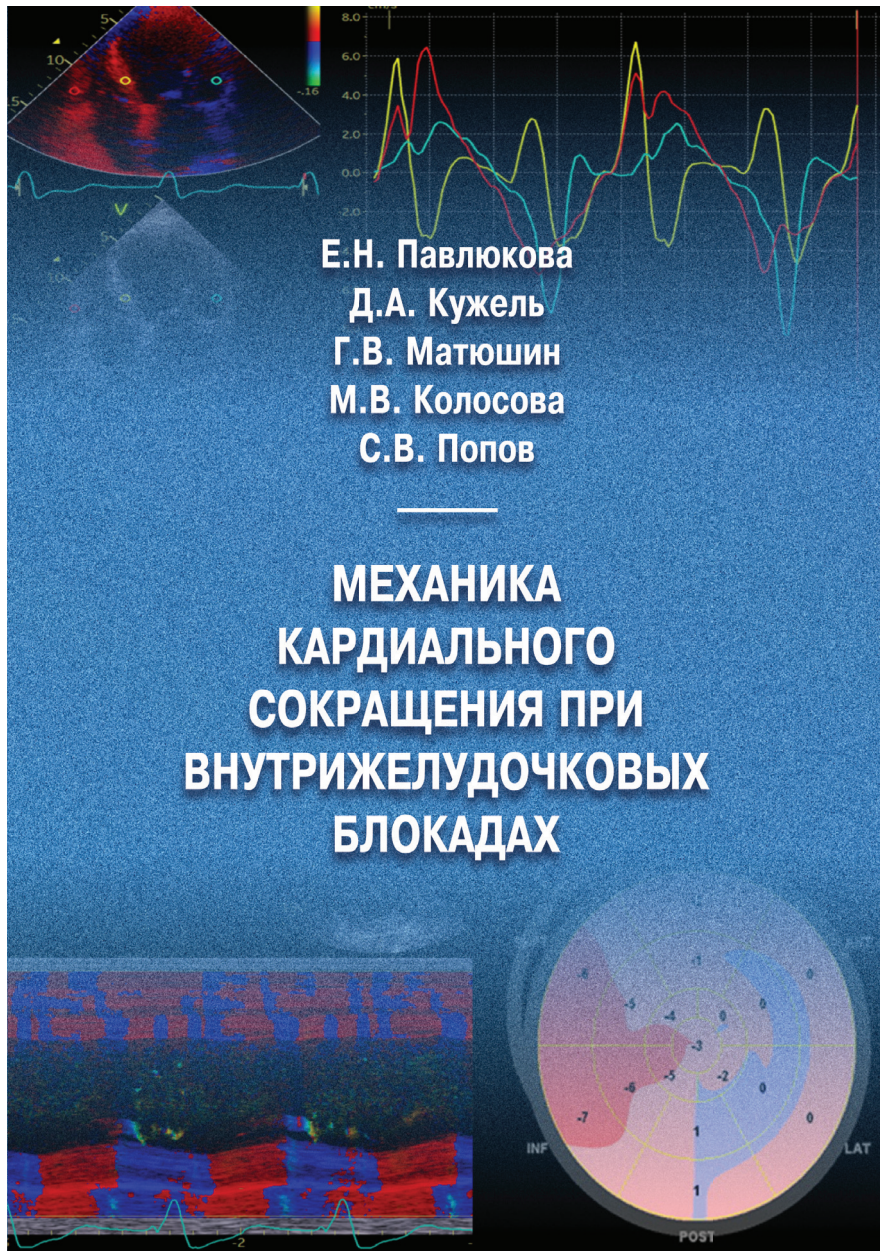
КАРДИО ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

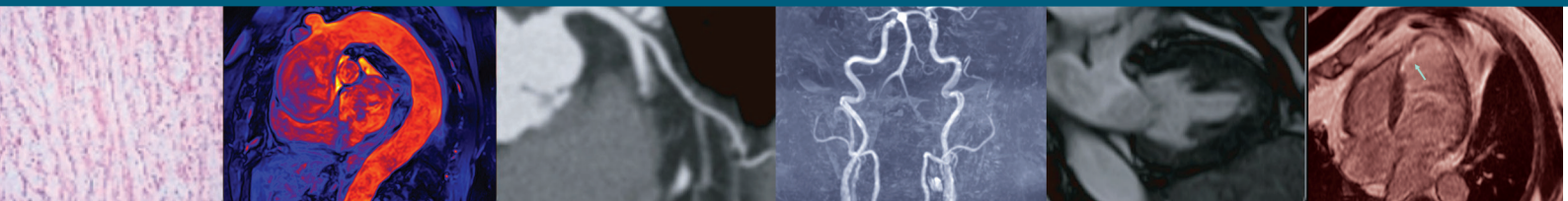
(27-28 апреля 2023 г., формат онлайн):

ультразвуковые, томографические, морфологические, радионуклидные и инвазивные методы диагностики в кардиологии; выбор оптимального диагностического каскада

Научная программа Форума предусматривает пленарные заседания, научные и сателлитные симпозиумы, профессорские лекции, круглые столы, мастер-классы, клинические разборы, образовательные семинары и школы, дискуссионные панели, научные конкурсы и другие формы профессионального общения.

ВЫШЛА В СВЕТ





Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ РЕЦЕНЗИРУЕМОЕ ИЗДАНИЕ

1'2023
Том 38