

РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ



Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: МЕДИЦИНА

2020 Том 24 № 4

Тема номера: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4

<http://journals.rudn.ru/medicine>

Научный журнал

Издается с 1997 г.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-61206 от 30.03.2015 г.

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор

СЕПИАШВИЛИ Реваз Исмаилович, член-корреспондент РАН, академик Академии наук Грузии, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии РУДН, Москва, Россия.

E-mail: wipocis@gmail.com *ORCID ID:* orcid.org/0000-0001-6091-1381

Заместители главного редактора

СЕМЯТОВ Саид Мухамьятович, д.м.н., профессор, кафедра акушерства и гинекологии РУДН, Москва, Россия.

E-mail: ssem@mail.ru

КАНОНИКА Вальтер, профессор, Университет Генуи, Италия. *E-mail:* canonica@unige.it

ВАЛЕНТА Рудольф, профессор, Венский медицинский университет, Вена, Австрия.

E-mail: rudolf.valenta@meduniwien.ac.at

Ответственный секретарь

ГУРЬЯНОВА Светлана Владимировна, к.б.н., доцент, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия. *E-mail:* svgur@mail.ru *ORCID ID:* orcid.org/0000-0001-6186-2462

Члены редакционной коллегии

АКДИС Мубацел, профессор, Научно-исследовательский институт по аллергии и астме, Давос, Швейцария;

БАХНА Сами, профессор, Университет Луизианны, Шреверпорт, США;

БЛАГОНРАВОВ Михаил Львович, д.м.н., профессор, кафедра общей патологии и патологической физиологии им. В.А. Фролова РУДН, Москва;

БЫКОВ Илья Михайлович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар;

ВЕСЕЛКИН Николай Петрович, д.м.н., профессор, академик РАН, лаборатория 9, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;

ГАБИБОВ Александр Габирович, академик РАН, д.х.н., профессор, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

ДЕЕВ Сергей Михайлович, д.б.н., профессор, академик РАН, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

ЕФРЕМОВ Анатолий Васильевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, кафедра патологической физиологии и клинической патофизиологии, Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск;

КАПЛАН Аллен, профессор, Медицинский университет Южной Каролины, Чарльстон, США;

КАТЕЛАРИС Конни, профессор, Университет Западного Сиднея, Австралия;

КОБАЛАВА Жанна Давидовна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, кафедра пропедевтики внутренних болезней РУДН, Москва;

КУСТОВИЦ Аднан, профессор, Имперский колледж Лондона, Великобритания;

МАРТИН Брайан, профессор, директор Медицинского института Университета штата Огайо, Колумбус, США;

МЕРКЭЛИ Бела, профессор, директор Кардиоцентра Университета Земмельвейса, Будапешт, Венгрия;

НАПАРСТЕК Яков, профессор, Университет Хадасса, Иерусалим, Израиль;

НОЗДРАЧЕВ Александр Данилович, д.м.н., профессор, академик РАН, лаборатория физиологии рецепции, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;

РОЩЕВСКИЙ Михаил Павлович, д.м.н., профессор, академик РАН, отдел сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;

СЕВЕРИН Евгений Сергеевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва;

СЛАВЯНСКАЯ Татьяна Александровна, д.м.н., профессор, Институт иммунофизиологии, Москва;

ХАВИНСОН Владимир Хацкелевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии РАН, Санкт-Петербург;

ЧЕХАНОВЕР Аарон, профессор, **лауреат Нобелевской премии**, Медицинский и научно-исследовательский институт Раппапорта, Технион – Израильский технологический институт, Хайфа, Израиль

RUDN University



RUDN JOURNAL OF MEDICINE

2020 Том 24 № 4

Theme of the issue: EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4

<http://journals.rudn.ru/medicine>

Founded in 1997

Founder: Peoples' Friendship University of Russia

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

SEPIASHVILI Revaz I., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Academician of the Georgian Academy of Sciences, MD, Professor, Head of the Department of Immunology and Allergology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow. *E-mail*: wipocis@gmail.com *ORCID ID*: orcid.org/0000-0001-6091-1381

Deputy Chief Editor

SEMYATOV Said M., MD, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow. *E-mail*: ssem@mail.ru

CANONICA Walter, MD, Professor, University of Genoa, Italy. *E-mail*: canonica@unige.it

VALENTA Rudolph, MD, Professor MD, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

E-mail: rudolf.valenta@meduniwien.ac.at

Executive Secretary

GURYANOVA Svetlana V., Ph.D., Associate Professor, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow. *E-mail*: svgur@mail.ru *ORCID ID*: orcid.org/0000-0001-6186-2462

Members of Editorial Board

AKDIS Mubacel, MD, Professor, Research Institute for Allergy and Asthma, Davos, Switzerland;

BAHNA Sami, MD, Professor, University of Louisiana, Shreveport, USA;

BLAGONRAVOV Mikhail L., MD, Professor, Frolov Department of General Pathology and Pathological Physiology Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow;

BYKOV Ilya M., MD, Professor, Head of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University, Krasnodar;

CIECHANOVER Aaron, MD, Professor, **Nobel Prize Winner**, Rappaport Medical and Research Institute, Technion – Israel Institute of Technology, Haifa, Israel;

CUSTOVIC Adnan, MD, Professor, Imperial College of London, Great Britain;

GABIBOV Alexander G., D. Sc., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow;

DEEV Sergey M., D. Sc., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow;

EFREMOV Anatoly V., MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Pathological Physiology and Clinical Pathophysiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk;

KAPLAN Allen, MD, Professor, University of Medicine, South Carolina, Charleston, USA;

KATELARIS Connie, MD, Professor, University of Western Sydney, Australia;

KHAVINSON Vladimir Kh., MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology RAS, St. Petersburg;

KOBALAVA Zhanna D., MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Propaedeutics of Internal Medicine Peoples' Friendship University of Russia, Moscow;

MARTIN Bryan, MD, professor, Director of the Ohio State University Medical Institute, Columbus, USA;

MERKELY Bela, MD, PhD, Professor and Chairman of Heart and Vascular Center, Rector of the University of Semmelweis, Budapest, Hungary;

NAPARSTEK Yakov, MD, Professor, University of Hadassah, Jerusalem, Israel;

NOZDRACHEV Alexander D., MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Reception Physiology Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;

ROSHCHEVSKY Mikhail P., MD, Professor, RAS Academician, Comparative Cardiology Department, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar;

SEVERIN Evgeniy S., MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, All-Russian Scientific Center for Molecular Diagnostics and Treatment, Moscow;

SLAVYANSKAYA Tatiana A., MD, Professor, Institute of Immunofisiology, Moscow;

VESELKIN Nikolai P., MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Laboratory 9, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg

Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: МЕДИЦИНА

ISSN 2313-0261 (online); 2313-0245 (print)

4 выпуска в год.

Входит в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ.

Языки: русский, английский.

Материалы журнала размещаются на платформе РИНЦ Российской научной электронной библиотеки, Electronic Journals Library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals.

Цели, задачи и тематика журнала

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал «Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина» выходит ежеквартально с 1997 года.

Цель журнала – интегрировать результаты научных исследований и богатый опыт отечественных и зарубежных специалистов в области клинической медицины и медико-биологических проблем, в первую очередь в области онкологии, физиологии и нейробиологии, аллергологии и иммунологии, медицинской генетики и микробиологии, инфекционных болезней.

Каждый выпуск является тематическим. Тематика каждого выпуска объявляется заранее. Для публикаций принимаются оригинальные статьи, обзоры, а также описание клинических случаев и современных методов диагностики.

Публикации в журнале принимаются по отдельности как на русском или английском языках, так и на обоих языках.

Число публикаций не по теме ограничено.

Авторы должны гарантировать, что статья не была опубликована раньше, в том числе частично и на других языках, и не находится на рассмотрении в других научных журналах.

Журнал ориентирован на ученых и преподавателей медицинских вузов, аспирантов и молодых ученых, практических врачей, ведущих поисковые работы по разработке новых и по усовершенствованию существующих профилактических, диагностических, лечебных и реабилитационных методов.

Решением ВАК Министерства образования и науки РФ журнал входит в «Перечень периодических изданий, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук».

Редакционная коллегия журнала приглашает к сотрудничеству ученых и научные коллективы по подготовке специальных тематических выпусков журнала.

Электронный адрес: svgur@mail.ru.

Литературный редактор: *К.В. Зенкин*

Компьютерная верстка: *М.В. Рогова*

Адрес издательства:

115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3

Тел.: (495) 955-07-16; e-mail: publishing@rudn.ru

Почтовый адрес редакции

ул. Миклухо-Маклая, д. 8, Москва, Россия, 117198

Тел.: +7 (910) 465-15-37

e-mail: svgur@mail.ru

Подписано в печать 01.10.2020 Выход в свет 10.10.2020. Формат 70×100/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура «Times, Roboto».

Усл. печ. л. 7,7. Тираж 500 экз. Заказ № 1042. Цена свободная.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Российский университет дружбы народов» (РУДН)

117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Отпечатано в типографии ИПК РУДН

115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3,

тел. (495) 952-04-41; publishing@rudn.ru

RUDN Journal of Medicine

ISSN 2313-0261 (online); 2313-0245 (print)

4 issues per year

Included in the list of peer-reviewed scientific publications of the higher attestation Commission of the Russian Federation. Languages: Russian, English.

The journal articles are posted at databases: Russian Science Citation Index, Electronic Journals Library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals.

Aim, tasks and topics of the journal

The “RUDN JOURNAL OF MEDICINE” is a quarterly journal that publishes peer-reviewed medical research papers since 1997.

A major goal of the journal is to integrate the results of basic and clinical research and rich experience of domestic and foreign experts in the field of clinical medicine and biomedical problems. Primary areas covered range from oncology, physiology and neurobiology, allergology and immunology, to medical genetics and microbiology, as well as infectious diseases.

Each issue is devoted to a specific medical topic that is announced in advance. We accept original research including important new tools and techniques, reviews, and clinical cases.

Papers may be submitted in Russian and/or English.

The number of off-topic articles is limited.

Authors must ensure that the article was not published elsewhere before, either as a whole or in part, in Russian or other languages. They should also guarantee that the paper submitted is not under consideration in other scientific journals.

The journal is intended for researchers and medical university lecturers and teachers, graduate students and young scientists, practitioners who do research to develop new and improve existing preventive, diagnostic, therapeutic and rehabilitation methods.

By the decision of the Higher Attestation Commission of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the journal is included in the “List of periodicals in which it is recommended to publish the main results of master’s and doctoral theses”. The Editorial Board of the journal encourages individual researches and research teams to collaborate in preparing issues devoted to specific topics.

Contact e-mail: svgur@mail.ru.

Review editor *K.V. Zenkin*
Computer design *M.V. Rogova*

Address of the Editorial Board:
3 Ordzhonikidze str., 115419 Moscow, Russian Federation
Ph. +7 (495) 952-04-41
e-mail: publishing@rudn.ru

Postal Address of the Editorial Board:
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198
Ph. +7 (495) 434-70-07; e-mail: svgur@mail.ru

Printing run 500 copies. Open price.

Peoples’ Friendship University of Russia (RUDN University)
6 Miklukho-Maklaya str., 117198 Moscow, Russian Federation

Printed at RUDN Publishing House:
3 Ordzhonikidze str., 115419 Moscow, Russian Federation,
Ph. +7 (495) 952-04-41; e-mail: publishing@rudn.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

- Попов К.А., Цымбалюк И.Ю., Сепиашвили Р.И., Быков И.М., Устинова Е.С., Быков М.И.**
Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте.....293
- Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В.** Особенности влияния *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L+CD63-, CD62L+CD63+ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком тканей.....304
- Дурнова Н.А., Каретникова А.Ю., Исаев Д.С., Кланцатая А.Р., Шереметьева А.С.**
Комплексное воздействие кофеина и диоксидина в тесте Порсолта на поведенческие реакции мышей.....316

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

- Унаньян К.Г., Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М., Эльбекьян К.С., Караков К.Г., Арутюнов С.Д.** Церамиды как биомаркеры хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом второго типа.....326
- Богданов С.М., Гладченко Д.А., Рощина Л.В., Челноков А.А.** Эффект супраспинальных влияний на проявление пресинаптического торможения Ia афферентов при разных типах мышечного сокращения у человека.....339
- Криштоп В.В., Румянцева Т.А., Никонорова В.Г.** Типологические особенности головного мозга в норме и при церебральной гипоперфузии.....346
- Нестерова И.В., Ковалева С.В., Халтурина Е.О., Чудилова Г.А.** Эффективность иммунопатогенетически обоснованной программы системной и локальной интерферонотерапии у иммунокомпromетированных детей раннего возраста354
- Рябов С.К., Меснянкина О.А.** Псевдопелада Брока: клиническое наблюдение.....368

CONTENTS

Theme of the issue: **EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY**

EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY

- Popov K.A., Tsymbalyuk I.Y., Sepiashvili R.I., Bykov I.M., Ustinova E.S., Bykov M.I.** Optimum marker selection of acute liver damage in rats in the experiment.....293
- Chudilova G.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadze I.V.** Regulatory cytokine effects in vitro on the phenotype of subpopulations CD62L+CD63-, CD62L+CD63+ and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer.....304
- Durnova N.A., Karetnikova A.Yu., Isaev D.S., Klantsataya A.R., Sheremetyeva A.S.** Complex effect of caffeine and dioxidine on behavioral responses in mice in Porsolt test.....316

CLINICAL PHYSIOLOGY

- Unanyan K.G., Balmasova I.P., Tsarev V.N., Mkrtumyan A.M., Elbekyan K.S., Karakov K.G., Arutyunov S.D.** Ceramids as biomarkers of chronic periodontitis associated with type 2 diabetes mellitus.....326
- Bogdanov S., Gladchenko D., Roshchina L., Chelnokov A.** Effect of supraspinal influences on the manifestation of presynaptic inhibition Ia afferents in different types of muscle contraction in humans.....339
- Chrishtop V.V., Rummyantseva T.A., Nikonorova V.G.** Typological features of the brain in normal conditions and in cerebral hypoperfusion.....346
- Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Khalturina E.O., Chudilova G.A.** Immunopathogenetically reasonable program effectiveness of systemic and local interferonotherapy in immunocompromised young children of systemic and local interferonotherapy in immunocompromised young children.....354
- Ryabov S.K., Mesnyankina O.A.** Pseudopelade of Brock: clinical observation.....368



EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303

Optimum marker selection of acute liver damage in rats in the experiment

K.A. Popov¹, I.Y. Tsymbalyuk¹, R.I. Sepiashvili², I.M. Bykov¹, E.S. Ustinova¹, M.I. Bykov¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

²Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

Annotation. *Relevance.* Assessment of liver damage and functional state is one of the leading tasks of clinical and laboratory diagnostics. Traditionally used methods for determining the activity of a number of indicator enzymes in blood with relative organ-specificity, such as aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, alkaline phosphatase, and γ -glutamyl transferase, have low specificity for liver diseases. In this regard, the determination of the optimal marker of acute liver injury is an urgent problem. *Aim.* The purpose of the study is to determine the dynamics of changes in liver damage markers in rats at different periods of reperfusion after 20 minutes of ischemia in order to select the indicators that most informatively characterize the state of test-animals under conditions of correction of ischemia-reperfusion syndrome. *Materials and methods:* the study was performed on 120 white nonlinear male rats weighing 200–250 grams. The animals were divided into 8 groups of 15 test-animals; all of them were simulated liver ischemia by clamping the analog of the hepatoduodenal ligament with a vascular clamp for 20 minutes. Then, blood was taken from different groups of rats at different reperfusion times – 5, 15, 30, 60, 120, 180 minutes, 8 hours and a day. In the blood plasma of laboratory animals, the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), glutathione transferase (GST), and lactate concentration were determined. *Results:* the results obtained allowed us to characterize two main peaks of indicators: a 5-minute period after restoration of blood flow – the maximum activity of glutathione transferase and lactate concentration, increased by 3.9–4.7 times; 60–180 minutes of reperfusion is the peak of aminotransferase activity, a significant increase in the activity of which begins 60 minutes after the restoration of blood flow and reaches its maximum by the 3rd hour of reperfusion, and LDH, the peak of which is recorded already by the 60th minute of revascularization. At the same time, after 8 hours of reperfusion, an obvious tendency for a decrease in all studied parameters was determined, which ends a day after modeling ischemia with a decrease to the level of control values. *Conclusion:* the assessment of organ damage in the ischemic period and the anti-ischemic effect of metabolic drugs can be carried out with the determination of an increase in lactate concentration and glutathione transferase activity almost immediately after restoration of blood flow. The development of injuries during the reperfusion period is more expedient to assess by determining AST, ALT and LDH after a 3-hour period of blood flow restoration, at which time the maximum values of markers are recorded under the condition of 20-minute total liver ischemia.

Key words: liver, ischemia, reperfusion, cytolysis, hepatocytes

© Popov K.A., Tsymbalyuk I.Y., Sepiashvili R.I., Bykov I.M., Ustinova E.S., Bykov M.I., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Author contributions. Popov K.A. – design and performance of experimental procedure; Tsymbalyuk I.Y. – planning and performance of experimental procedure with test animals; Sepiashvili R.I. – results and discussion, article writing; Bykov I.M. – concept and design of study, results and discussion; Ustinova E.S. – results and discussion; Bykov M.I. – planning and performance of experimental procedure.

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

Financing. The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation № АААА-А18–118122690052–3.

Received 29.08.2020. 2020. Accepted 11.09.2020.

For citation: Popov K.A., Tsymbalyuk I.Y., Sepiashvili R.I., Bykov I.M., Ustinova E.S., Bykov M.I. Optimum marker selection of acute liver damage in rats in the experiment. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):293–303. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303

Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте

К.А. Попов¹, И.Ю. Цымбалюк¹, Р.И. Сепиашвили², И.М. Быков¹,
Е.С. Устинова¹, М.И. Быков¹

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

² Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Оценка повреждения и функционального состояния печени является одной из ведущих задач клинико-лабораторной диагностики. Традиционно используемые методы определения в крови активности ряда индикаторных ферментов, обладающих относительной органоспецифичностью, таких как аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, сорбитолдегидрогеназа, щелочная фосфатаза и γ -глутамилтрансфераза обладают низкой их специфичностью по отношению к заболеваниям печени. В связи с этим определение оптимального маркера острого повреждения печени является актуальной проблемой. *Цель:* определение динамики изменений маркеров повреждения печени у крыс на разных сроках реперфузии после 20-ти минутной ишемии для выбора показателей, наиболее информативно характеризующих состояние животных в условиях проведения коррекции ишемически-реперфузионного синдрома. *Материалы и методы:* исследование проведено на 120 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–250 грамм. Животные были разделены на 8 групп по 15 особей, всем животным выполнялось моделирование ишемии печени путем пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки сосудистым зажимом на 20 минут. Затем у разных групп крыс производили забор крови в разные сроки реперфузии – 5, 15, 30, 60, 120, 180 минут, 8 часов и сутки. В плазме крови лабораторных животных определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глутатионтрансферазы (ГСТ) и концентрацию лактата. *Результаты:* полученные результаты позволили охарактеризовать два основных пика показателей: 5-минутный период после восстановления кровотока – максимум активности глутатионтрансферазы и концентрации лактата, увеличенных в 3,9–4,7 раза; 60–180 минут реперфузии – пик активности аминотрансфераз, значительный рост активности которых начинается с 60-ти минут после восстановления кровотока и достигает максимума к 3-му часу реперфузии, и ЛДГ, пик активности которой регистрируется уже к 60-й минуте ревазуляризации. При этом через 8 часов реперфузии определена очевидная тенденция снижения всех изученных показателей, которая заканчивается спустя сутки после моделирова-

ния ишемии снижением до уровня контрольных значений. *Заключение:* оценка повреждения органа в ишемическом периоде и противоишемического действия метаболических препаратов может проводиться с определением нарастания концентрации лактата и активности глутатионтрансферазы практически сразу после восстановления кровотока. Развитие повреждений в реперфузионный период более целесообразно оценивать путем определения АСТ, АЛТ и ЛДГ после 3-часового периода восстановления кровотока, в это время регистрируются максимальные значения маркеров при условии 20-минутной тотальной ишемии печени.

Ключевые слова: печень, ишемия, реперфузия, цитолиз, гепатоциты

Вклад авторов: Попов К.А. – дизайн и выполнение лабораторной части исследования; Цымбалюк И.Ю. – непосредственное планирование и выполнение экспериментальной работы с лабораторными животными; Сепиашвили Р.И. – обсуждение результатов исследования, написание текста статьи; Быков И.М. – концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов; Устинова Е.С. – обсуждение результатов, оформление введения и формулировка заключения; Быков М.И. – планирование и выполнение экспериментальной части исследования.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Информация о финансировании. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № АААА-А18-118122690052-3.

Поступила 29.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Попов К.А., Цымбалюк И.Ю., Сепиашвили 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. Т. 24. № 4. С. 293-303. DOI: 293–303. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303

In medical practice, the assessment of liver damage and functional state is one of the leading tasks of clinical and laboratory diagnostics. For this purpose, the determination of the activity of a number of indicator enzymes in the blood with relative organ-specificity is traditionally used, such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase and γ -glutamyltransferase [1]. A change in the activity of aminotransferases often indicates cytolysis of liver cells, the activity of alkaline phosphatase increases with cholestasis [2, 3]. Taking into account the protein-synthesizing function of the liver, in some cases it can be informative to determine the content of serum albumin in the blood plasma, especially in chronic diseases, and the prothrombin time, which reflects the activity of blood coagulation factors, also synthesized in the liver. Against the background of the detoxification function, the determination of bilirubin and its metabolites may be informative [4]. The main disadvantage of all the listed markers is their low specificity in relation to liver diseases. Meanwhile, by verification of liver damage by

other methods, the assessment of the above indicators is justified for laboratory monitoring purposes [5, 6]. There are dynamic methods for assessing the functional state of the liver, based on determining the rate of metabolism in the liver of various substrates, such as bromsulphthalein, indocyanine green, lidocaine, etc. [7–9]. These methods are rarely used in clinical practice, since they are invasive, require complex equipment and a long study time. The principles and approaches to the assessment of experimental liver damage in rats are similar; however, there are features associated with the severity and diagnostic significance of certain markers, as well as with the dynamics of changes in the process of damage [10, 11].

The purpose of the present study was to determine the dynamics of changes in liver damage markers in rats at different periods of reperfusion after 20 minutes of ischemia in order to select the indicators that characterize the state of animals under conditions of correction of ischemia-reperfusion syndrome most informatively.

Material and methods

The study was carried out on 120 laboratory animals, white non-linear male rats (weighing 200–250 grams). The animals were divided into 8 groups of 15 test-animals; all animals were simulated liver ischemia by clamping the analog of the hepatoduodenal ligament with a vascular clamp for 20 minutes. Then, blood was taken from different groups of rats at different reperfusion times – 5, 15, 30, 60, 120, 180 minutes, 8 hours and a day. Experimental work with laboratory animals was performed under general anesthesia using Zoletil 100 (Virbac, France) at a dosage of 10 mg/kg intramuscularly. The study was approved by the independent ethics committee at the FSBEI HE «KubSMU» of the Ministry of Health Care of Russia (Protocol No. 51 of May 23rd, 2017) and was carried out in accordance with the principles set out in the «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals» (Strasbourg, 1986). Comparison of the data obtained in the experiment in the rats of the experimental groups was also carried out with the results of evaluating similar indicators in the group of intact animals (control group, n = 20) kept in similar conditions [2].

In the blood plasma of laboratory animals, the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), and lactate concentration were determined by kinetic methods using the Vital Development Corporation reagent kits (St. Petersburg, Russia). The activity of glutathione transferase (GST) was determined according to a method involving the registration of changes in optical density at 340 nm as a result of condensation of glutathione with dinitrochlorobenzene [12].

The data obtained were statistically processed by means of the AnalystSoft Inc. software and the statistical analysis program StatPlus, Version 7 (link: www.analystsoft.com/ru/). Taking into account the small sample size and abnormal distribution (assessed by the Shapiro-Wilk test), the nonparametric Kruskal-Wallis test (for several independent groups) was used to determine the significance of differences between the parameters of the groups of animals with different reperfusion times, as well as the control group with the subsequent (if necessary) pairwise comparison

by means of the Mann-Whitney test. The results are presented in the article as a median, error bars reflect the spread between the 25th and 75th percentiles. Differences between the group indicators were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Analysis of changes in classical markers in the dynamics of the development of ischemia-reperfusion damage in rats showed different results for the activity of ALT, AST, LDH, GST and lactate concentration. The activity of all markers increased already at the 5th minute of reperfusion, but later on, the dynamics of indicators was different. ALT activity (Table 1) increased by the 5th minute of the reperfusion period by 2.1 times, a further statistically significant increase in this indicator was recorded after 60 minutes of reoxygenation; the ALT activity during this period was 3.8 times higher than the control indices. 3 hours after the restoration of blood flow in the ischemic liver, the activity of the analyzed marker reached its maximum values in blood plasma – 8.8 times higher than that of intact animals. After that, the ALT activity gradually decreased during the day, so 8 hours after the start of reperfusion, the activity exceeded the control figures by 5.2 times, and after a day – only by 1.6 times. One of the interesting features is that a wide scatter of indicators in animals at the stages of 1 and 2 hours of reperfusion should be highlighted, which can be regarded as an increase in ALT activity in animals, manifested to varying degrees depending on the individual characteristics of the animals, different initial states of the organism. At the same time, a statistically significant increase in the indicator was recorded only in the group of animals after a 3-hour period of blood flow restoration. This makes it possible to recommend the use of this period in experimental studies of ischemia-reperfusion syndrome, including its correction, more reasonably. To use a 1–2 hour reperfusion period for the same purposes, it is necessary to consider the possibility of either increasing the sample or preliminary assessment of the resistance of rats to hypoxia-reoxygenation.

Table 1

Changes in hepatocyte cytolysis markers at different periods of reperfusion after 20-minute ischemia of rat liver (Me(p0,25/p0,75))

Studied groups/ Reperfusion time	Studied indices		
	ALT, U/l	AST, U/l	LDH, U/l
Control	23,5 (18,4/25,5)	44,6 (42,9/51,9)	152,3 (99,2/167,5)
5 min.	49,8 (45,1/60,0)*	62,2 (55,1/67,0)*	224,5 (203,8/313,5)*
15 min.	78,6 (51,8/93,7)*	65,3 (47,8/100,3)*	325,0 (227,0/521,5)*
30 min.	47,4 (44,5/78,2)*	85,2 (80,0/90,7)*	498,0 (479,0/544,0)*
60 min.	89,6 (82,1/138,5)**	156,6 (130,8/199,6)**	1519,0 (971,4/2585,0)**
120 min.	84,4 (77,4/143,8)*	85,6 (82,1/159,6)*	1113,4 (823,7/1545,9)*
180 min.	207,9 (149,1/241,5)**	240,9 (156,6/268,9)**	1112,8 (764,3/1320,3)*
8 h.	121,8 (93,8/170,1)*	118,55 (86,8/176,7)**	459,5 (308,2/783,8)**
1 day	38,3 (33,9/48,2)**	79,8 (68,7/82,4)**	390,7 (330,8/450,7)*

Note:* – statistically significant differences (p<0,05) from the same index of the control group; ^ – statistically significant differences (p<0,05) from the index of the previous group.

The dynamics of AST activity during the development of reperfusion syndrome practically coincided with that for ALT (Table 1). A feature was the initially higher values of the enzyme activity in animals of the control group and in animals of the experimental groups accordingly against the background of a pathological process. AST activity, as well as ALT activity, increased by 1.4 times already after 5 minutes of reperfusion. 60 minutes after the restoration of blood flow in the vascular bundle of the hepatic hilus, the AST activity exceeded the control values by 3.5 times. This period (60–120 minutes of reperfusion) was also characterized by amplitude changes in the activity of the enzyme with a significant increase by the 3rd hour of reoxygenation – up to values 5.4 times higher than the level of a similar parameter in intact rats. Determination of AST activity after 8 hours and a day showed a gradual decrease in the indicator, similar to the dynamics of changes in ALT activity. In general, the increase in ALT activity was characterized by high relative values in comparison with the group of intact animals.

The dynamics of changes in LDH activity in animals of the experimental groups was significantly different (Table 1). There was also a slight increase in the parameter already 5 minutes after the restoration of blood flow – by 1.5 times. Subsequently, the average values of the enzyme activity and the scatter of the index within the group gradually increased, but a statistically significant increase in the marker was recorded by the 60th minute of reperfusion, while the values of LDH activity increased by 7.3–10.0 times in animals after 2- and 3-hour reoxygenation. Later, as well as for aminotransferases, a decrease in the activity of the analyzed enzyme was recorded, which did not reach the control values. Thus, the main feature of the dynamics of LDH activity was the achievement of the maximum value already by 60 minutes of reperfusion and the absence of a peak in the indicator after 180 minutes of the experiment.

Table 2

Changes in hepatocyte cytolysis markers at different periods of reperfusion after 20-minute ischemia of rat liver (Me(p0,25/p0,75))

Studied groups/ Reperfusion time	Studied indices	
	GST, U/l	Lactate, mmol/l
Control	0,023 (0,020/0,026)	2,8 (2,6/3,0)
5 min.	0,108 (0,094/0,120)*	11,0 (10,6/11,4)*
15 min.	0,095 (0,067/0,127)*	8,0 (7,0/8,3)**
30 min.	0,087 (0,085/0,101)*	8,1 (6,8/10,5)*
60 min.	0,123 (0,112/0,192)**	7,0 (6,8/9,2)*
120 min.	0,052 (0,050/0,056)**	3,9 (3,8/4,9)**
180 min.	0,050 (0,048/0,058)*	5,9 (4,3/6,1)*
8 h.	0,030 (0,025/0,037)^	5,1 (4,3/6,7)*
1 day	0,027 (0,025/0,031)	2,5 (2,3/2,7)^

Note:* – statistically significant differences (p<0,05) from the same index of the control group; ^ – statistically significant differences (p<0,05) from the index of the previous group.

The activity of glutathione transferase changed in a different way (Table 2), in contrast to the activity of transaminases and LDH. The most significant increase in the activity of the analyzed enzyme was observed already at the 1st stage of the experiment after 5 minutes of reperfusion. The activity of glutathione transferase in this period increased by 4.7 times. Subsequently, a slight increase in activity was determined after 60 minutes of restoration of blood flow – the value of the considered indicator exceeded the control figures by 5.3 times, which was especially distinguished against the background of a slight trend towards a decrease in enzymatic activity in animals after 15–30 minutes of reperfusion. Against the background of 2-hour reperfusion, the activity of glutathione transferase decreased to a level 2.3 times higher than the control values, and after 8 hours it did not differ from the value of the corresponding parameter in the group of intact rats.

The concentration of lactate is not a marker of hepatocyte cytolysis, but it was interesting to follow its changes against the background of its expected growth in the presence of hypoxia. In fact, the concentration of the analyzed metabolite was maximal immediately, i.e. 5 minutes after the end of the ischemic period. At this stage, the concentration of lactate exceeded the control values by 3.9 times. During further observation, the content of lactic acid in blood plasma progressively decreased. The most significant points of decrease in lactate concentration were 15 minutes and 120 minutes, in addition, the normal level of lactic acid was determined one day after the restoration of blood flow.

Thus, in our opinion, two main peaks of indicators can be distinguished: a 5-minute period after the restoration of blood flow – the maximum activity of

glutathione transferase and the concentration of lactic acid; 60–180 minutes of reperfusion is the peak of aminotransferase activity, a significant increase in the activity of which began from 60 minutes after the restoration of blood flow and reached a maximum by the 3rd hour of reperfusion and LDH, the peak of which was recorded already by the 60th minute of revascularization. An increase in the first two indicators by the 5th minute of the experiment is associated with changes in the ischemic period, an increase in the activity of AST, ALT and LDH to a greater extent reflects an increase in liver damage during the reperfusion period, the time limits of the main damaging effect of which are also indicated by an increase in glutathione transferase activity and a delay in the decrease in concentration lactate.

Conclusion

Depending on the goals and objectives, a reasonable choice of one or another marker of liver damage in an acute experiment is required. Assessment of organ damage in the ischemic period and the anti-ischemic effect of metabolic drugs can be carried out by determining the increase in lactate concentration and glutathione transferase activity almost immediately after the restoration of blood flow. It is more expedient to evaluate the development of injuries during the reperfusion period using the classic markers of hepatocyte cytolysis – AST, ALT, and LDH. More homogeneous and easily comparable results can be obtained when determining these indicators after a 3-hour period of blood flow restoration, at the same time the maximum values of markers are recorded under the condition of 20-minute total liver ischemia.

Во врачебной практике оценка повреждения и функционального состояния печени является одной из ведущих задач клинико-лабораторной диагностики. Для этого традиционно используют определение в крови активности ряда индикаторных ферментов, обладающих относительной органоспецифичностью, таких как аспаргатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), сорбитолдегидрогеназа, щелочная фосфатаза и γ -глутамилтрансфераза [1]. Изменение активности аминотрансфераз чаще свидетельствует о цитолизе клеток печени, активность щелочной фосфатазы возрастает при холестазах [2, 3]. Учитывая белоксинтезирующую функцию печени, в ряде случаев информативным может быть определение содержания сывороточного альбумина в плазме крови, особенно при хронических заболеваниях, и протромбинового времени, отражающего активность факторов свертывания крови, также синтезируемых в печени. Учитывая детоксикационную функцию, информативным может быть определение билирубина и его метаболитов. Главным недостатком всех перечисленных маркеров является низкая их специфичность по отношению к заболеваниям печени [4]. Между тем при условии верификации повреждения печени другими методами оценка вышеперечисленных показателей оправдана для целей лабораторного мониторинга [5, 6]. Существуют динамические методы оценки функционального состояния печени, основанные на определении скорости метаболизирования в печени различных субстратов, таких как бромсульфалеин, индоцианин зеленый, лидокаин и др. [7–9]. Данные методы применяются достаточно редко в клинической практике, поскольку инвазивны, требуют сложного оборудования и длительного времени исследования. Принципы и подходы к оценке экспериментального повреждения печени у крыс и других лабораторных животных аналогичны, однако, имеются особенности, связанные с выраженностью и диагностической значимостью тех или иных маркеров, динамикой изменений в процессе повреждения [10, 11].

Целью настоящего исследования было определение динамики изменений маркеров повреждения печени у крыс на разных сроках реперфузии после

20-минутной ишемии для выбора показателей, наиболее информативно характеризующих состояние животных в условиях проведения коррекции ишемически-реперфузионного синдрома.

Материалы и методы

Исследование проведено на 120 лабораторных животных – белые нелинейные крысы-самцы (массой 200–250 грамм). Животные были разделены на 8 групп по 15 особей, всем животным выполнялось моделирование ишемии печени путем пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки сосудистым зажимом на 20 минут. Затем у разных групп крыс производили забор крови в разные сроки реперфузии – 5, 15, 30, 60, 120, 180 минут, 8 часов и сутки. Выполнение экспериментальных работ с лабораторными животными проводили на фоне общей анестезии с использованием Золетила 100 («Virbac», France) в дозировке 10 мг/кг внутримышечно. Исследование было одобрено независимым этическим комитетом при ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 51 от 23.05.2017 г.) и осуществлялось в соответствии с принципами, изложенными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986). Сравнение данных, полученных в эксперименте у крыс опытных групп, также проводили с результатами оценки аналогичных показателей у группы интактных животных (контрольная группа, $n=20$), содержащихся в аналогичных условиях [2].

В плазме крови лабораторных животных активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрацию лактата определяли кинетическими методами с использованием наборов реагентов «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Санкт-Петербург, Россия). Активность глутатионтрансферазы (ГСТ) определяли по способу, предполагающему регистрацию изменений оптической плотности при 340 нм в результате конденсации глутатиона с динитрохлорбензолом [12].

Для статистической обработки полученных данных использовали программное обеспечение AnalystSoft Inc., StatPlus – программа статистического анализа. Версия 7. (www.analystsoft.com/ru/).

С учетом небольшого размера выборок и отличного от нормального характера распределения (оценивали по критерию Шапиро–Вилка) для определения значимости различий между показателями групп животных с разным временем реперфузии, а также контрольной группы использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса (для нескольких независимых групп) с последующим (при необходимости) попарным сравнением с помощью критерия Манна–Уитни. Результаты в статье представлены в виде медианы, планки погрешностей отражают разброс между 25-м и 75-м процентилями. Различия между показателями групп считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ изменений классических маркеров в динамике развития ишемически-реперфузионного повреждения у крыс показал разные результаты для активности АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГСТ и концентрации лактата. Активность всех маркеров возрастала уже на 5-й минуте реперфузии, но в дальнейшем динамика показателей была различной. Активность АЛТ (таблица 1) увеличивалась к 5-й минуте реперфузионного периода в 2,1 раза, дальнейший статистически значимый рост рассматриваемого показателя был зафиксирован после 60-минутной реоксигенации, активность АЛТ в этот период была

в 3,8 раза выше контрольных цифр. Спустя 3 часа после восстановления кровотока в ишемизированной печени активность анализируемого маркера достигала своих максимальных значений в плазме крови – в 8,8 раза выше показателя интактных животных. После этого активность АЛТ постепенно в течение суток снижалась, так, через 8 часов после начала реперфузии активность превышала контрольные цифры в 5,2 раза, а через сутки – только в 1,6 раза. Из интересных особенностей следует выделить широкий разброс показателей у животных на этапах 1–2-часовой реперфузии, что можно расценивать как рост активности АЛТ у животных, проявляющийся в разной степени в зависимости от индивидуальных особенностей животных, разного исходного состояния организма. При этом статистически значимое увеличение показателя было зафиксировано только в группе животных после 3-часового периода восстановления кровотока. Это позволяет более обосновано рекомендовать использовать данный период в экспериментальных исследованиях ишемически-реперфузионного синдрома, в том числе его коррекции. Для использования 1–2-часового периода реперфузии с теми же целями необходимо рассмотреть возможность или увеличения выборки, или предварительной оценки резистентности крыс к гипоксии-реоксигенации.

Таблица 1

Изменение маркеров цитолиза гепатоцитов в разные сроки реперфузии после 20-минутной ишемии печени крыс (Me(p0,25/p0,75))

Исследуемые группы / время реперфузии	Исследуемые показатели		
	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЛДГ, ед/л
Контроль	23,5 (18,4/25,5)	44,6 (42,9/51,9)	152,3 (99,2/167,5)
5 мин	49,8 (45,1/60,0)*	62,2 (55,1/67,0)*	224,5 (203,8/313,5)*
15 мин	78,6 (51,8/93,7)*	65,3 (47,8/100,3)*	325,0 (227,0/521,5)*
30 мин	47,4 (44,5/78,2)*	85,2 (80,0/90,7)*	498,0 (479,0/544,0)*
60 мин	89,6 (82,1/138,5)**	156,6 (130,8/199,6)**	1519,0 (971,4/2585,0)**
120 мин	84,4 (77,4/143,8)*	85,6 (82,1/159,6)*	1113,4 (823,7/1545,9)*
180 мин	207,9 (149,1/241,5)**	240,9 (156,6/268,9)**	1112,8 (764,3/1320,3)*
8 ч	121,8 (93,8/170,1)*	118,55 (86,8/176,7)**	459,5 (308,2/783,8)**
сутки	38,3 (33,9/48,2)**	79,8 (68,7/82,4)**	390,7 (330,8/450,7)*

Примечание: * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от соответствующего показателя контрольной группы; ^ – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от показателя предыдущей группы.

Динамика активности АСТ в процессе развития реперфузионного синдрома практически совпадала с таковой для АЛТ (таблица 1). Особенностью были исходно более высокие значения активности фермента у животных контрольной группы и соответственно у животных опытных групп на фоне патологического процесса. Активность АСТ, также как и АЛТ, увеличивалась в 1,4 раза уже спустя 5 минут реперфузии. Спустя 60 минут после восстановления кровотока в сосудистом пучке ворот печени активность АСТ превышала контрольные значения в 3,5 раза. Для этого периода (60–120 минут реперфузии) также были характерны амплитудные изменения активности фермента со значительным ростом его к 3-м часам реоксигенации – до значений в 5,4 раза превышающим уровень аналогичного параметра интактных крыс. Определение активности АСТ через 8 часов и сутки показала постепенное снижение показателя, аналогичное динамике изменений активности АЛТ. В целом же увеличение активности АЛТ характеризовалось большими от-

носительными значениями в сравнении с группой интактных животных.

Динамика изменений активности ЛДГ у животных опытных групп существенно отличалась (таблица 1). Также отмечался небольшой рост параметра уже через 5 минут после восстановления кровотока – в 1,5 раза. В дальнейшем постепенно увеличивались средние значения активности фермента и разброс показателя внутри группы, но статистически значимый рост маркера был зафиксирован к 60-й минуте реперфузии с сохранением увеличенных в 7,3–10,0 раза значений активности ЛДГ у животных после 2-х и 3-х часовой реоксигенации. В дальнейшем также как и для аминотрансфераз регистрировалось снижение активности анализируемого фермента, не достигающее контрольных значений. Таким образом, основной особенностью динамики активности ЛДГ было достижение максимального значения уже к 60-ти минутам реперфузии и отсутствие пика показателя через 180 минут эксперимента.

Таблица 2

Изменение маркеров цитолиза гепатоцитов в разные сроки реперфузии после 20-ти минутной ишемии печени крыс (Me(p0,25/p0,75))

Исследуемые группы / время реперфузии	Исследуемые показатели	
	ГСТ, ед/л	Лактат, ммоль/л
Контроль	0,023 (0,020/0,026)	2,8 (2,6/3,0)
5 мин	0,108 (0,094/0,120)*	11,0 (10,6/11,4)*
15 мин	0,095 (0,067/0,127)*	8,0 (7,0/8,3)*^
30 мин	0,087 (0,085/0,101)*	8,1 (6,8/10,5)*
60 мин	0,123 (0,112/0,192)**	7,0 (6,8/9,2)*
120 мин	0,052 (0,050/0,056)**	3,9 (3,8/4,9)*^
180 мин	0,050 (0,048/0,058)*	5,9 (4,3/6,1)*
8 ч	0,030 (0,025/0,037)^	5,1 (4,3/6,7)*
Сутки	0,027 (0,025/0,031)	2,5 (2,3/2,7)^

Примечание: * – статистически значимые отличия (p<0,05) от соответствующего показателя контрольной группы; ^ – статистически значимые отличия (p<0,05) от показателя предыдущей группы.

Активность глутатионтрансферазы изменялась другим образом (таблица 2), в отличие от активности трансаминаз и ЛДГ. Наиболее значительное увеличение активности анализируемого фермента наблюдалось уже на 1-м этапе эксперимента – после 5-минутной реперфузии. Активность глутатионтрансферазы в этом периоде была увеличена

в 4,7 раза. В дальнейшем было определено еще небольшое увеличение активности через 60 минут восстановления кровотока – значение рассматриваемого показателя превышала контрольные цифры в 5,3 раза, что особенно выделялось на фоне небольшой тенденции к снижению ферментативной активности у животных после 15–30-минутной ре-

перфузии. На фоне 2-часовой реперфузии активность глутатионтрансферазы снижалась до уровня, в 2,3 раза превышающего контрольные значения, а спустя 8 часов уже не отличалась от значения соответствующего параметра группы интактных крыс.

Концентрация лактата конечно не является маркером цитолиза гепатоцитов, однако проследить за ее изменениями было интересно, учитывая ожидаемый ее рост на фоне гипоксии. На самом деле концентрация анализируемого метаболита была максимальна сразу – спустя 5 минут после окончания ишемического периода. На этом этапе концентрация лактата превышала контрольные значения в 3,9 раза. В ходе дальнейшего наблюдения содержание молочной кислоты в плазме крови прогрессирующе снижалось. Наиболее значительными точками уменьшения концентрации лактата были 15 минут и 120 минут, кроме того нормальный уровень молочной кислоты был определен через сутки после восстановления кровотока.

Таким образом, на наш взгляд можно выделить два основных пика показателей: 5-минутный период после восстановления кровотока – максимум активности глутатионтрансферазы и концентрации молочной кислоты; 60–180 минут реперфузии – пик активности аминотрансфераз, значительный рост активности которых начинался с 60-ти минут после восстановления кровотока и достигал максимума к 3-му часу реперфузии и ЛДГ, пик активности которой регистрировался уже к 60-й минуте ревазуляризации. Увеличение первых двух показателей к 5-й минуте эксперимента связано с изменениями в ишемический период, увеличение активности АСТ, АЛТ и ЛДГ в большей степени отражает нарастание повреждений печени в реперфузионный период, временные границы основного повреждающего действия которого также обозначены ростом активности глутатионтрансферазы и задержкой снижения концентрации лактата.

Выводы

В зависимости от целей и задач требуется обоснованный выбор того или иного маркера повреждения печени в остром эксперименте. Оценка повреждения органа в ишемическом периоде

и противоишемического действия метаболических препаратов может проводиться с определением нарастания концентрации лактата и активности глутатионтрансферазы практически сразу после восстановления кровотока. Развитие повреждений в реперфузионный период более целесообразно оценивать с использованием классических маркеров цитолиза гепатоцитов – АСТ, АЛТ и ЛДГ. Более однородные и легко сравнимые результаты можно получить при определении данных показателей после 3-часового периода восстановления кровотока, в это же время регистрируются максимальные значения маркеров при условии 20-минутной тотальной ишемии печени.

References

1. Voloshchuk O., Kopylchuk G. Serum sorbitol dehydrogenase activity as a sensitive marker of liver damage. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2015;2(14):94–99. (In Russ).
2. Tsybalyuk I.Y., Manuilov A.M., Popov K.A., Basov A.A. Metabolic correction of the ischemia-reperfusion injury with sodium dichloroacetate in vascular isolation of the liver in experiment. *Novosti Khirurgii*. 2017;25(5):447–453. doi: 10.18484/2305-0047.2017.5.447. (In Russ.)
3. Saidi R.F., Kenari S.K. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview. *J. Invest. Surg.* 2014;27(6):366–379. doi:10.3109/08941939.2014.932473.
4. Liang J., Zhou Y., Wang Z., Chen H. Relationship between liver damage and serum levels of IL-18, TNF-alpha and NO in patients with acute pancreatitis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010;30(8):1912–1914.
5. Basov A.A., Elkina A.A., Samkov A.A., Volchenko N.N., Baryshev M.G., Dzhimak S.S., et al. Influence of deuterium-depleted water on the isotope D/H composition of liver tissue and morphological development of rats at different periods of ontogenesis. *Iranian Biomedical Journal*. 2019;23(2):129–141.
6. Johansen M.J., Gade J., Stender S., Frithioff-Bøjsøe C., Lund M AV., Chabanova E., et al. The effect of overweight and obesity on liver biochemical markers in children and adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020;105(2): dgz010. doi:10.1210/clinem/dgz010.
7. Dzidzava I.I., Slobodyanik A.V., Kudryavtseva A.V., Zheleznyak I.S., Kotiv B.N., Alentyev S.A., et al. The results of CT-volumetry and clearance test with indocyanine green as indications for preoperative portal vein embolization. *Annals of HPB surgery*. 2016;21(3):34–46. (In Russ).
8. Halle B.M., Poulsen T.D., Pedersen H.P. Indocyanine green plasma disappearance rate as dynamic liver function test in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2014;58(10):1214–1219. doi:10.1111/aas.12406.
9. Sakka S.G. Assessment of liver perfusion and function by indocyanine green in the perioperative setting and in critically ill

- patients. *J. Clin. Monit. Comput.* 2018;32(5):787–796. doi:10.1007/s10877-017-0073-4.
10. Dzhimak S.S., Basov A.A., Volchenko N.N., Samkov A.A., Baryshev M.G., Fedulova L.V. Changes in the functional activity of mitochondria isolated from the liver of rat that passed the preadaptation to ultra-low deuterium concentration. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;476(1):323–325.
 11. Ge Y., Zhang Q., Jiao Z., Li H., Bai G., Wang H. Adipose-derived stem cells reduce liver oxidative stress and autophagy induced by ischemia-reperfusion and hepatectomy injury in swine. *Life Sci.* 2018;214:62–69. doi:10.1016/j.lfs.2018.10.054.
 12. Karpishchenko A.I. Handbook. *Medical Laboratory Technology*. Sankt-Petersburg: Intermedika, 2002. (In Russ).

Библиографический список

1. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П. Активность сорбитолдегидрогеназы сыворотки как чувствительный маркер повреждения печени // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2015. № 2 (14). С. 94–99.
2. Цымбалюк И.Ю., Мануйлов А.М., Попов К.А., Басов А.А. Метаболическая коррекция дихлорацетатом натрия ишемически-реперфузионного повреждения при сосудистой изоляции печени в эксперименте // Новости хирургии. 2017. 25 (5). С. 447–453. doi: 10.18484/2305-0047.2017.5.447.
3. Saidi R.F., Kenari S.K. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview // *J. Invest. Surg.* 2014. V. 27 (6). P. 366–379. doi:10.3109/08941939.2014.932473.
4. Liang J., Zhou Y., Wang Z., Chen H. Relationship between liver damage and serum levels of IL-18, TNF-alpha and NO in patients with acute pancreatitis // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010. V. 30 (8). P. 1912–1914.
5. Basov A.A., Elkina A.A., Samkov A.A., Volchenko N.N., Baryshev M.G., Dzhimak S.S., et al. Influence of deuterium-depleted water on the isotope D/H composition of liver tissue and morphological development of rats at different periods of ontogenesis // *Iranian Biomedical Journal*. 2019. V. 23. № 2. P. 129–141.
6. Johansen M.J., Gade J., Stender S., Frithioff-Bøjsøe C., Lund M. AV., Chabanova E., et al. The effect of overweight and obesity on liver biochemical markers in children and adolescents // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020. V. 105 (2). dgz010. doi:10.1210/clinem/dgz010.
7. Дзидзава И.И., Слободяник А.В., Кудрявцева А.В., Железняк И.С., Котив Б.Н., Алентьев С.А., и др. Применение КТ-вольтометрии и клиренс-теста с индоцианином зеленым для определения показаний к предоперационной эмболизации воротной вены // *Анналы хирургической гепатологии*. 2016. Т. 21 (3). С. 34–46.
8. Halle B.M., Poulsen T.D., Pedersen H.P. Indocyanine green plasma disappearance rate as dynamic liver function test in critically ill patients // *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2014. V. 58 (10). P. 1214–1219. doi:10.1111/aas.12406.
9. Sakka S.G. Assessment of liver perfusion and function by indocyanine green in the perioperative setting and in critically ill patients // *J. Clin. Monit. Comput.* 2018. V. 32 (5). P. 787–796. doi: 10.1007/s10877-017-0073-4.
10. Dzhimak S.S., Basov A.A., Volchenko N.N., Samkov A.A., Baryshev M.G., Fedulova L.V. Changes in the functional activity of mitochondria isolated from the liver of rat that passed the preadaptation to ultra-low deuterium concentration // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. V. 476. № 1. P. 323–325.
11. Ge Y., Zhang Q., Jiao Z., Li H., Bai G., Wang H. Adipose-derived stem cells reduce liver oxidative stress and autophagy induced by ischemia-reperfusion and hepatectomy injury in swine // *Life Sci.* 2018. V. 214. P. 62–69. doi:10.1016/j.lfs.2018.10.054.
12. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб: Интермедика, 2002. 600 с.

Corresponding author: Popov Konstantin Andreevich – PhD, Associate Professor of the department of fundamental and clinical biochemistry Kuban State Medical University, 350063, Russia, Krasnodar, Sedina str., 4. E-mail: naftalin444@mail.ru

Popov K.A. ORCID: 0000-0002-3649-1361, SPIN: 9456-9710

Tsybalyuk I. Yu. ORCID0000-0002-5711-6659, SPIN-код: 4493-0738

Sepiashvili R.I. ORCID: 0000-0001-8112-2082, SPIN-код: 6921-7356

Bykov I.M. ORCID0000-0001-7325-536, SPIN-код: 9977-6613

Ustinova E.S. ORCID0000-0003-1916-2897

Bykov M.I. ORCID: 0000-0001-6806-1414, SPIN-код: 2909-3520

Ответственный за переписку: Попов Константин Андреевич – к.м.н., ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии Кубанского государственного медицинского университета, 350063, Россия, г. Краснодар, улица Седина, дом 4. E-mail: naftalin444@mail.ru

Попов К.А. SPIN: 9456-9710; ORCID: 0000-0002-3649-1361

Цымбалюк И.Ю. SPIN-код: 4493-0738; ORCID0000-0002-5711-6659

Сепиашвили Р.И. SPIN-код: 6921-7356; ORCID: 0000-0001-8112-2082

Быков И.М. SPIN-код: 9977-6613; ORCID0000-0001-7325-536

Устинова Е.С. ORCID0000-0003-1916-2897

Быков М.И. SPIN-код: 2909-3520; ORCID: 0000-0001-6806-1414

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314

Особенности влияний *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком

Г.А. Чудилова¹, И.В. Нестерова^{1,2}, С.В. Ковалева¹, Л.В. Ломтатидзе¹

¹Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация

²Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Нейтрофильные гранулоциты (НГ) первыми из клеток иммунной системы мигрируют к опухоли и активно вовлекаются в реализацию полноценного противоопухолевого ответа через механизмы прямого киллинга клеток опухоли, внеклеточного лизиса (NET), так и через активацию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), ингибирование ангиогенеза, инициации других клеток, обладающих противоопухолевой активностью. *Цель:* изучить влияние цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF на субпопуляции CD62L⁺CD63⁻ и CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность НГ пациентов с колоректальным раком (КРР) в системе *in vitro*. *Материалы и методы.* Исследованы образцы периферической крови (ПК) 10 пациентов обоего пола 38–70 лет с впервые выявленным нелеченым КРР II–III стадии (группа исследования) и 10 условно-здоровых добровольцев (группа сравнения). Проведена оценка субпопуляций CD62L⁺CD63⁺НГ, CD62L⁺CD63⁻НГ методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, США), цитохимическими методами тестировались микробицидные функции НГ: активность NADPH-оксидаз, миелопероксидазы (МП), уровень катионного белка (КБ) в спонтанных тестах и при дополнительной нагрузке *S.aureus*. В обеих исследуемых группах изучалось влияние цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF на субпопуляции и микробицидную активность НГ системе *in vitro*. Данные подвергали обработке непараметрическими методами статистики с помощью программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010, результаты представлены как медиана с интерквартильным размахом – Me (Q₁; Q₃). Значимость различий между группами рассчитывали с использованием U-критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. *Результаты.* Установлены особенности трансформации субпопуляций CD62L⁺CD63⁻НГ и CD62L⁺CD63⁺НГ ПК при КРР, позволяющие получить представление о способности НГ к роллингу и готовности активировать микробицидный арсенал, различные дефекты спонтанной и индуцированной микробицидной активности кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов НГ. В эксперименте *in vitro* показаны эффекты влияния цитокинов на НГ при КРР, которые свидетельствуют о возможности регулирования рецепторных и микробицидных функций НГ, с другой стороны, позволяют говорить о дефектах восприятия НГ регулирующих стимулов, что подтверждается прогрессированием опухолевого роста.

Ключевые слова: колоректальный рак, нейтрофильные гранулоциты, субпопуляции, цитокины, микробицидные функции

© Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Вклад авторов: Чудилова Г.А. – разработка методологии, проведение исследования, подготовка текста; Нестерова И.В. – разработка концепции, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; Ковалева С.В. – проведение исследования, проведение статистического анализа; Ломтатидзе Л.В. – проведение исследования.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (проект № АААА-А18–118122690053–0).

Поступила 25.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Особенности влияний *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком тканей // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 304–314. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314

Regulatory cytokine effects *in vitro* on the phenotype of subpopulations CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer

G.A. Chudilova¹, I.V. Nesterova^{1,2}, S.V. Kovaleva¹, L.V. Lomtadze¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Annotation. Relevance. Neutrophilic granulocytes (NG) are the first cells of the immune system to migrate to the tumor and are actively involved in the implementation of a full-fledged antitumor response through the mechanisms of direct killing of tumor cells, extracellular lysis (NET), and through the activation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), inhibition of angiogenesis, initiation of other cells with antitumor activity. *The aim of the study* was to study the effect of cytokines IFN α , IFN γ , G-CSF on the CD62L⁺CD63⁻ and CD62L⁺CD63⁺ subsets and the microbicidal activity of NGs in patients with colorectal cancer (CRC) *in vitro*. *Materials and methods.* We studied samples of peripheral blood (PB) of 10 patients of both sexes 38–70 years old with newly diagnosed untreated CRC stage II–III (study group) and 10 healthy volunteers (comparison group). The subsets CD62L⁺CD63⁺ NG, CD62L⁺CD63⁻ NG were assessed by flow cytometry (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, USA), the microbicidal functions of NG were tested by cytochemical methods: activity of NADPH–oxidases, myeloperoxidase (MP), level of cationic protein (CP) in spontaneous tests and under additional stress of *S. aureus*. The effect of IFN α , IFN γ , G-CSF cytokines on subsets and the microbicidal activity of NG *in vitro* was studied in both study groups. Microsoft Excel 2016 and StatPlus 2010 were used for statistical processing of the obtained data using nonparametric tests: Me (Q1; Q3), Mann-Whitney U-test and Wilcoxon test. *Results.* The features of transformation of CD62L⁺CD63⁻ NG and CD62L⁺CD63⁺ NG subsets of PB in CRC have been established, that allows to get an idea of the NG ability to roll and readiness to activate the microbicidal arsenal, various defects of spontaneous and induced microbicidal activity of oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of NG. The effects of cytokine influence on NG in CRC *in vitro* have been shown, which indicates the possibility of regulating the receptor and microbicidal functions of NG, and, on the other hand, suggests defects in NG perception of regulatory stimuli, that is confirmed by the progression of tumor growth.

Key words: colorectal cancer, neutrophilic granulocytes, subset, cytokines, microbicidal functions

Author contributions: Chudilova G.A. – development of methodology, research, preparation of the text; Nesterova I.V. – concept development, text editing, approval of the final version of the article; Kovaleva S.V. – conducting research, conducting statistical analysis; research, Lomtadze L.V. – research.

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

Financing. The study was funded by the Ministry of health of the Russian Federation (project no. AAAA-A18-118122690053-0). Received 25.08.2020. Accepted 11.09.2020.

For citation: Chudilova G.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadze I.V. Regulatory cytokine effects in vitro on the phenotype of subpopulations CD62L+CD63-, CD62L+CD63+ and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):304–314. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314

Введение

Ежегодно диагностируется более миллиона случаев колоректального рака (КРР) в мире [1]. В основном заболевание возникает спорадически и не связано с наследственной генетической мутацией. При изучении патогенеза злокачественности КРР ранее основное внимание уделялось исследованию особенностей поведения эпителиальных клеток, но в течение последнего десятилетия в фокусе внимания находится микроокружение опухоли, в частности, взаимодействие стромальных, эпителиальных и иммунных клеток [2, 3]. Незатихающий интерес исследователей к НГ связан с их важной и противоречивой ролью в развитии рака [4–7]. Современные научные данные показывают, что НГ являются активными участниками противоопухолевой защиты. НГ первыми мигрируют к опухоли (опухольассоциированные ТАН) под влиянием хемокинов CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL8 (IL-8), цитокинов (TNF α и IFN γ), ростовых факторов (G-CSF, GM-CSF), LTB $_4$, PAF, лигандов рецепторов комплемента (C5a, C3a), N-формилпептидов (FPR-1, FPR-2), которые являются хемоаттрактантами, и молекул адгезии (ICAM-1 и PECAM-1) на клеточной поверхности НГ и эндотелиальных клетках [8–10]. НГ способны проявлять противоопухолевую активность, рекрутируя и активируя клетки иммунной системы (Т-клетки, НК и дендритные клетки) [2, 11].

НГ продуцируют ряд антимикробных медиаторов, которые обладают потенциальной онкоцидной активностью, включая активные формы кислорода (АФК), миелопероксидазу (МП), перекись водорода (H $_2$ O $_2$) и протеазы [12]. Супероксидные радикалы, образующиеся при активации NADPH-оксидазы, оказывают цитопатическое действие. В дополнение к H $_2$ O $_2$ -зависимой «спонтанной» цитотоксичности, НГ являются мощными медиаторами Fc-рецептор-зависимой АЗКЦ против опсонизированных антигенами

опухолевых клеток. Литический потенциал в реакциях АЗКЦ связан с экзоцитозом азурофильных гранул и активностью их основного компонента-МП [13].

Доказано, что про- и противоопухолевая активность НГ определяется микроокружением, т.е. средой, которую создают комплексные цитокиновые и хемокиновые влияния. При этом цитокины и хемокины продуцируются как самой опухолью, так и клетками иммунной системы, проникающими в опухоль. НГ способны трансформировать свой фенотип и функции в ответ на изменения цитокинового (G-CSF, IFN γ , TNF α) и хемокинового (CCL-2, CCL-5, CXCL5 и IL-8), окружения, что способствует их преобразованию в НГ с противоопухолевыми свойствами [14–16]. Изменение архитектоники поверхностных цитоплазматических рецепторов мембраны НГ связано с их праймированием и осуществлением эффекторных функций. У пациентов с раковыми заболеваниями (эпителиальные карциномы) описаны нарушения мобилизации НГ (дефекты хемотаксиса), ассоциированные со снижением уровня экспрессии рецепторов, приводящие к дефектам АЗКЦ [17].

Процессы адгезии, миграции и хемотаксиса иницируют активацию и полноценное функционирование НГ. Так рецептор адгезии CD62L (селектин L, LAM-1, LECAM-1) участвует в роллинге и перемещении НГ в очаг воспаления или опухоль. Рецептор CD63 (тетраспанин, ME491, LAMP-3, NK1-C3) выполняет регуляторную роль белков-посредников передачи сигналов активации, роста и подвижности НГ. При экспрессии CD63 на поверхностной цитоплазматической мембране НГ осуществляется кратковременный сигнал усиливающий адгезивную активность CD11/CD18. Также известно, что CD63 является маркером азурофильных гранул, по уровню экспрессии которых можно судить об интенсивности реализации МП. Было описано, что CD63 играет критическую роль во многих биологических процессах, включая опухолевый рост и метастазирование

при нескольких типах рака. Показано, что снижение экспрессии белка CD63 – предиктор неблагоприятного прогноза при раке пищевода [18]. Выявлено, что повышенная экспрессия CD63 способствует ингибированию злокачественности плоскоклеточного рака языка (TSCC) и метастазированию в лимфатические узлы, что может иметь значение в прогнозировании исходов заболевания, в том числе при проведении генной терапии пациентов с TSCC [19].

Однако все еще недостаточно сведений о роли НГ при развитии КРР в сопоставлении с особенностями фенотипа их функционально-значимых субпопуляций ПК и возможности воздействия на рецепторные и микробицидные функции клеток различными цитокинами, что с нашей точки зрения представляет несомненный интерес.

Целью исследования явилось изучение влияния цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF на субпопуляции CD62L⁺CD63⁻ и CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность НГ пациентов с КРР в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исследованы образцы ПК 10 пациентов (38–70 лет) с впервые выявленным КРР (КРР II–III стадии развития неопластического процесса, с гистологически подтвержденной аденокарциномой), не получавшие ранее лучевой терапии, курсов полихимиотерапии, иммунотерапии перед оперативным вмешательством, и образцы ПК 10 условно-здоровых добровольцев (38–70 лет) – группа сравнения.

Все пациенты и условно-здоровые добровольцы подписали информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Кубанского государственного медицинского университета.

В исследуемых группах методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, США) определялись субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ, CD62L⁺CD63⁻НГ (%НГ и уровень экспрессируемых молекул (MFI)), цитохимическими методами тестировались микробицидные функции: активность NADPH-оксидаз, МП, уровень неферментного катионного белка (КБ) в спонтанных тестах и при дополнительной нагрузке *S.aureus* (штамм 209).

В нагрузочных тестах *in vitro* исследовалось влияние цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF и мЦТ (цитокиновый микст, содержащий изучаемые цитокины в соотношении 1:1:1) на субпопуляции НГ CD62L⁺CD63⁺, CD62L⁺CD63⁻, и микробицидную цитотоксическую (NADPH-оксидаза, МП, КБ) активность НГ. Для этого ПК пациентов с КРР и условно-здоровых взрослых лиц инкубировали (60 мин при T-37°C) с цитокинами в концентрации 10⁻⁷ г/л.

Данные подвергали обработке непараметрическими методами статистики с помощью программ Microsoft Exel 2016 и StatPlus 2010, результаты представлены как медиана с интерквартильным размахом – Me (Q₁; Q₃). Значимость различий между группами рассчитывали с использованием U-критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. Различия показателей полагали статистически обоснованными с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерия Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

При сравнении уровня лейкоцитов и НГ в исследуемых группах не выявлено значимых различий в показателях, как общего количества лейкоцитов у пациентов с КРР – 5,6 (5,06; 6,67) $\times 10^9$ /л против 4,75 (4,02; 5,1) $\times 10^9$ /л в группе сравнения, так и относительного 66 (56,5; 76,75)% против 55,5 (54,25; 59,75)% в группе сравнения и абсолютного 3,54 (2,83; 5,29) $\times 10^9$ /л против 2,85 (2,30; 2,86) $\times 10^9$ /л в группе сравнения, количества НГ ($p > 0,05$) (Рис. 1).

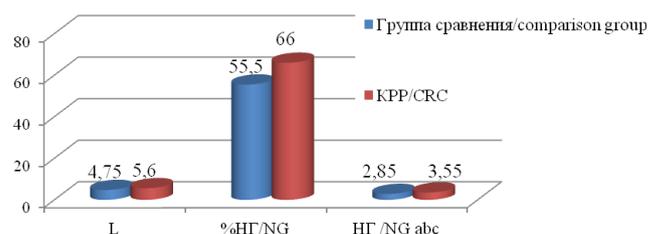


Рис. 1. Общее количество лейкоцитов и нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови пациентов с колоректальным раком (КРР).

Fig. 1. The total number of leukocytes and neutrophilic granulocytes in the peripheral blood of patients with colorectal cancer (CRC).

Детекция поверхностных мембранных рецепторов CD62L и CD63 выявила что, у условно-здоровых взрослых лиц 93,9(91,08;94,48)% НГ представлены субпопуляцией CD62L⁺CD63⁻НГ с MFI CD62L – 9,47(8,2;11,98)

и в 4,4(3,3;5,8)% – субпопуляцией CD62L⁺CD63⁺НГ, при этом уровень экспрессии CD62L по MFI составил 4,4 (3,33; 6,56), и уровень экспрессии CD63 по MFI – 4,89 (3,99; 6,98). (Таблица 1).

Таблица 1

Субпопуляции CD62L⁺CD63⁺ и CD62L⁺CD63⁻ нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с колоректальным раком и условно-здоровых взрослых лиц (Me(Q₁; Q₃))

Table 1

Subsets of CD62L⁺CD63⁺ and CD62L⁺CD63⁻ neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer and healthy adults (Me (Q₁; Q₃))

Группа/ Group	CD62L ⁺ CD63 ⁺ НГ /(NG)			CD62L ⁺ CD63 ⁻ НГ/(NG)	
	НГ,% NG,%	MFI CD62L	MFI CD63	НГ,% NG,%	MFI CD62L
Группа сравнения/ Comparison group	4,4 (3,3; 5,8)	4,4 (3,33;6,56)	4,89 (3,99; 6,98)	93,9 (91,08; 94,48)	9,47 (8,2; 11,98)
КРР/ CRC	33,55* (16,6;63,3)	3,14 (2,93;4,45)	10,45* (9,04;12,5)	61,5* (34,03;78,90)	10,75 (9,19;13,15)

Примечание:* – различия показателей пациентов с КРР по сравнению с условно-здоровыми взрослыми статистически обоснованы с ошибкой 1 рода p<0,05 (критерий Манна–Уитни).

Note: * – the differences in indicators of patients with CRC compared to conventionally healthy adults are statistically substantiated with a type 1 error p <0.05 (Mann–Whitney test).

При КРР отмечается значительное увеличение в 7,62 раза% НГ с активированным фенотипом CD62L⁺CD63⁺НГ на фоне повышения в 2,13 раза MFI CD63 (p<0,05) и уменьшения уровня экспрессии по MFI CD62L – в 1,4 раза (p>0,05), при этом выявлено снижение количества НГ субпопуляции

CD62L⁺CD63⁻НГ с неменяющимся уровнем экспрессии CD62L рецептора (Рис. 2).

Установлено, что при КРР имеют место различные дефекты кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов НГ (Рис. 3).

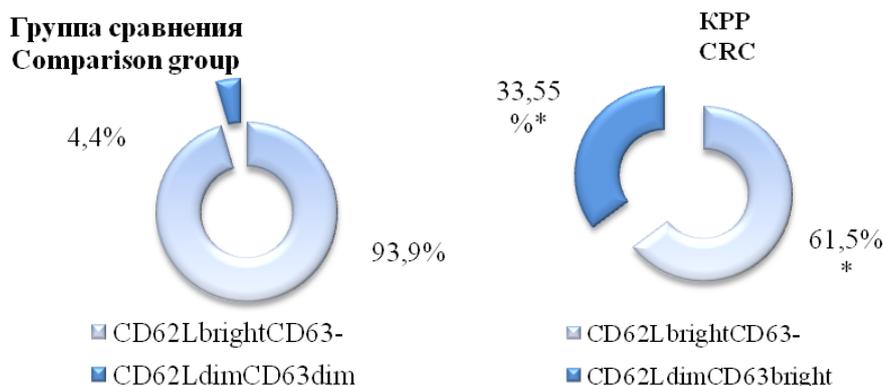


Рис. 2. Содержание и фенотипические особенности субпопуляций CD62L⁺CD63⁺ и CD62L⁺CD63⁻ нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с колоректальным раком и условно – здоровых взрослых лиц

Примечание:* – различия показателей пациентов с КРР по сравнению с условно-здоровыми взрослыми статистически обоснованы с ошибкой 1 рода p<0,05 (критерий Манна–Уитни).

Fig. 2. Content and phenotypic features of subsets CD62L⁺CD63⁺ and CD62L⁺CD63⁻ neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer and healthy adults

Note: * – the differences in indicators of patients with CRC compared to conventionally healthy adults are statistically substantiated with a type 1 error p <0.05 (Mann–Whitney test).

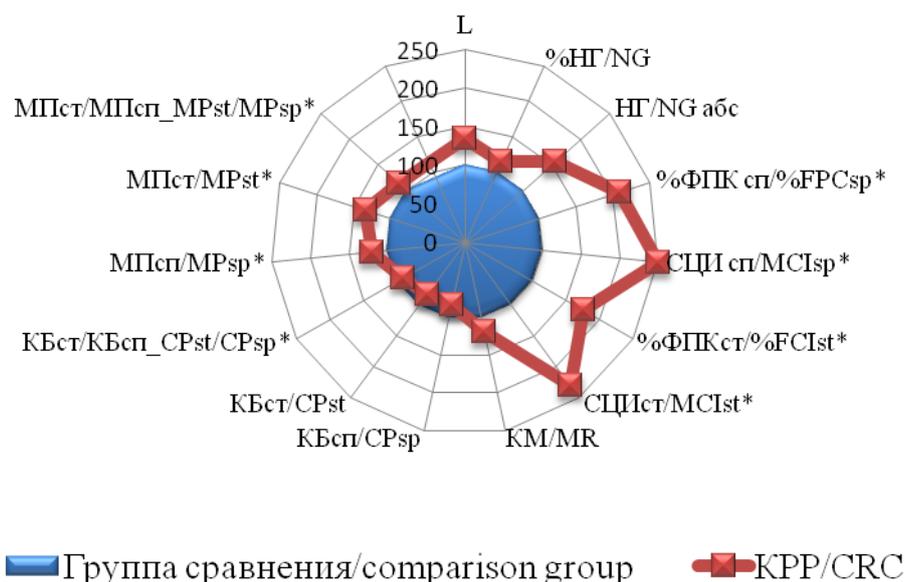


Рис. 3. Состояние микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке (процент от показателей условно-здоровых лиц)

Fig. 3. The state of the microbicidal system of neutrophilic granulocytes in colorectal cancer (% of the indicators of healthy individuals)

*Примечание:** – различия показателей пациентов с КРР по сравнению с условно-здоровыми взрослыми (контроль) статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Note: * – the differences in indicators of patients with CRC compared to conventionally healthy adults are statistically substantiated with a type 1 error $p < 0.05$ (Mann–Whitney test).

Так, показано, что у пациентов с КРР активность NADPH-оксидаз, оцениваемая в NBT спонтанном – тесте (%ФПК, СЦИ) была в 2,1 раза выше, чем у условно-здоровых субъектов ($p < 0,05$) (Рис. 3). При дополнительной нагрузке БАГ в стимулированном NBT-тесте сохранялся адекватный ответ, что отразилось в показателях КМ – 2,79 (2,18; 2,97) ($p > 0,05$) (Рис. 3).

При этом при КРР уровень КБ в НГ был ниже, чем у условно-здоровых лиц – 2,14 (0,63; 1,70) против 2,56 (2,36; 2,67) в группе сравнения ($p < 0,05$). Последующая нагрузка БАГ, вызывала дополнительное расходование КБ ($p < 0,05$), что отразилось в снижении значения КР – 0,68 (0,66; 0,70) ($p < 0,05$).

В противоположность этому у пациентов с КРР наблюдалась повышенная активность МП – 2,74 (2,66; 2,80) против 2,26 (2,09; 2,41) в группе сравнения ($p < 0,05$), но отсутствовал адекватный ответ

на антигенную нагрузку *S. aureus* in vitro. Выявлено снижение интенсивности расходования МП после нагрузки БАГ, по сравнению с условно-здоровыми взрослыми субъектами.

Таким образом, показано, что снижение количества НГ и/или трансформация уровней экспрессии соответствующих мембранных маркеров приводят к нарушениям миграции НГ, недостаточны для полноценного проявления прямой и АЗКЦ, а также для реализации микробицидной киллинговой функции, о чем свидетельствует прогрессирование злокачественного роста.

Под влиянием цитокинов $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF, МЦТ в системе in vitro отмечается усиление активации НГ, что проявляется значимым увеличением (в 1,7–2 раза) количества НГ субпопуляции $CD62L^+CD63^+НГ$ по сравнению с базовым уровнем, установленным у пациентов с КРР ($p < 0,05$), и уве-

личением в 13 раз по сравнению с содержанием у условно – здоровых лиц ($p < 0,05$). Кроме того, показано снижение количества НГ субпопуляции $CD62L^+CD63^-$ НГ в 2 раза по сравнению с уровнем у пациентов с КРР до инкубации с цитокинами ($p < 0,05$) и в 3,5 раза ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). При этом MFI $CD62L$ и MFI $CD63$ не из-

менились и не отличались от таковых у пациентов с КРР и у условно-здоровых лиц.

Необходимо отметить, что при КРР эффекты влияния $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ были установлены только в 40–50 % случаев ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно), тогда как в 50–60 % случаев изучаемые показатели не отличались от фонового уровня при КРР (Рис. 4).

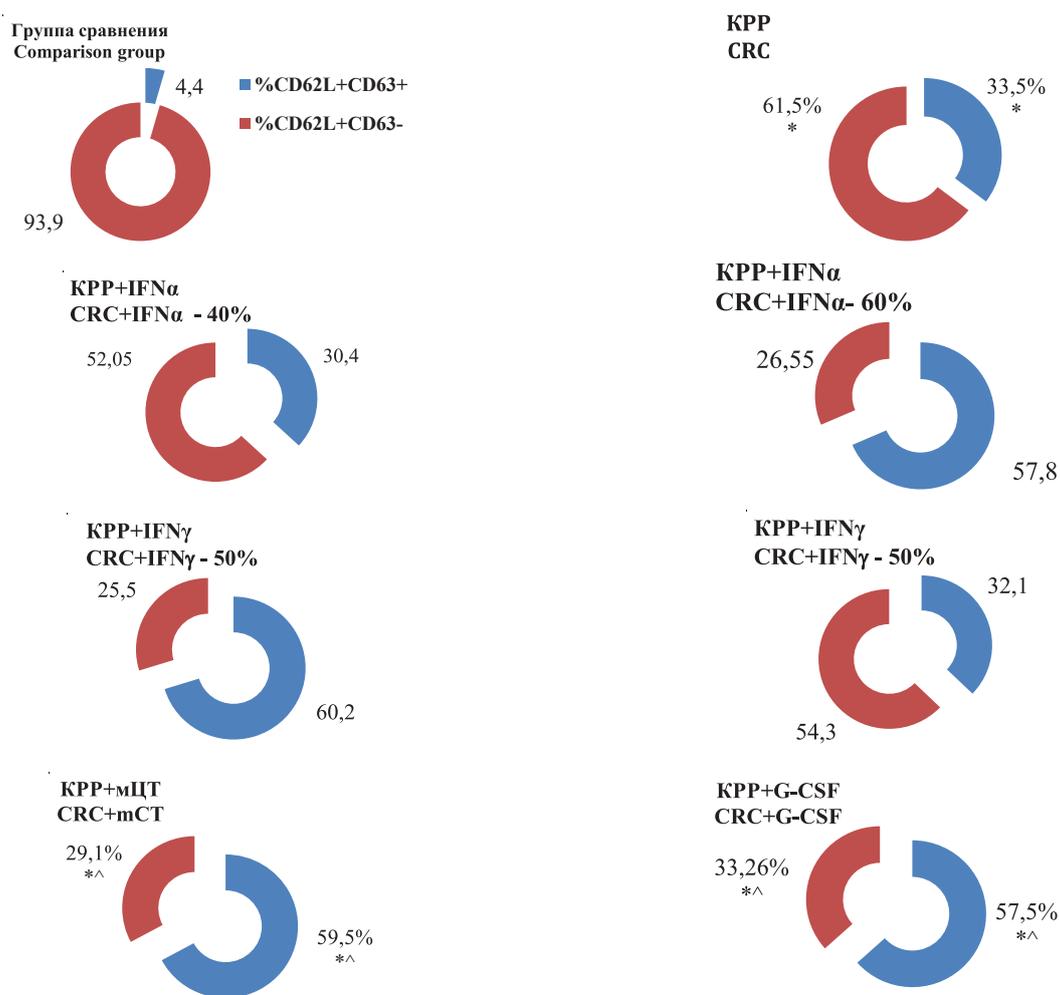


Рис. 4. Влияние цитокинов на субпопуляции $CD62L^+CD63^+$ и $CD62L^+CD63^-$ нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с колоректальным раком

Примечание: * – различия показателей от условно-здоровых взрослых статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни)

^ – различия показателей пациентов с колоректальным раком до инкубации и после инкубации с цитокинами статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Fig. 4. Influence of cytokines on subpopulations $CD62L^+CD63^+$ and $CD62L^+CD63^-$ neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer

Note: * – the differences in the parameters of healthy adults are statistically substantiated with an error of type 1 $p < 0.05$.

^ – differences in indicators of patients with colorectal cancer before incubation and after incubation with cytokines are statistically substantiated with a type 1 error $p < 0.05$

Модулирующие эффекты изучаемых цитокинов отмечались и при анализе показателей кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов НГ, ассоциированных с реагированием на цитокиновый стимул рецепторного аппарата НГ для обеспечения адекватного ответа.

Так, отмечено отсутствие влияния $IFN\alpha$ на активность NADPH-оксидаз у пациентов с КРР как в спонтанном, так и в стимулированном NBT-тестах (Рис. 5). Ответы НГ, зарегистрированные по показателям % ФПК и СЦИ, на цитокины $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ и при нагрузке БАГ отличались по интенсивности.

Под влиянием $IFN\gamma$ и G-CSF в 40 % случаев (1 группа) наблюдалось усиление активности NADPH-оксидаз (% ФПК и СЦИ) как в спонтанном, так стимулированном NBT-тесте. При этом было выявлено влияние $IFN\gamma$, G-CSF в 60 % случаев (2 группа), которое сопровождалось угнетением синтеза активных форм кислорода. Следует отметить сохранение способности к развитию адекватной реакции на БАГ в NBT-стимулированном тесте при воздействии $IFN\gamma$ и G-CSF (Рис. 5).

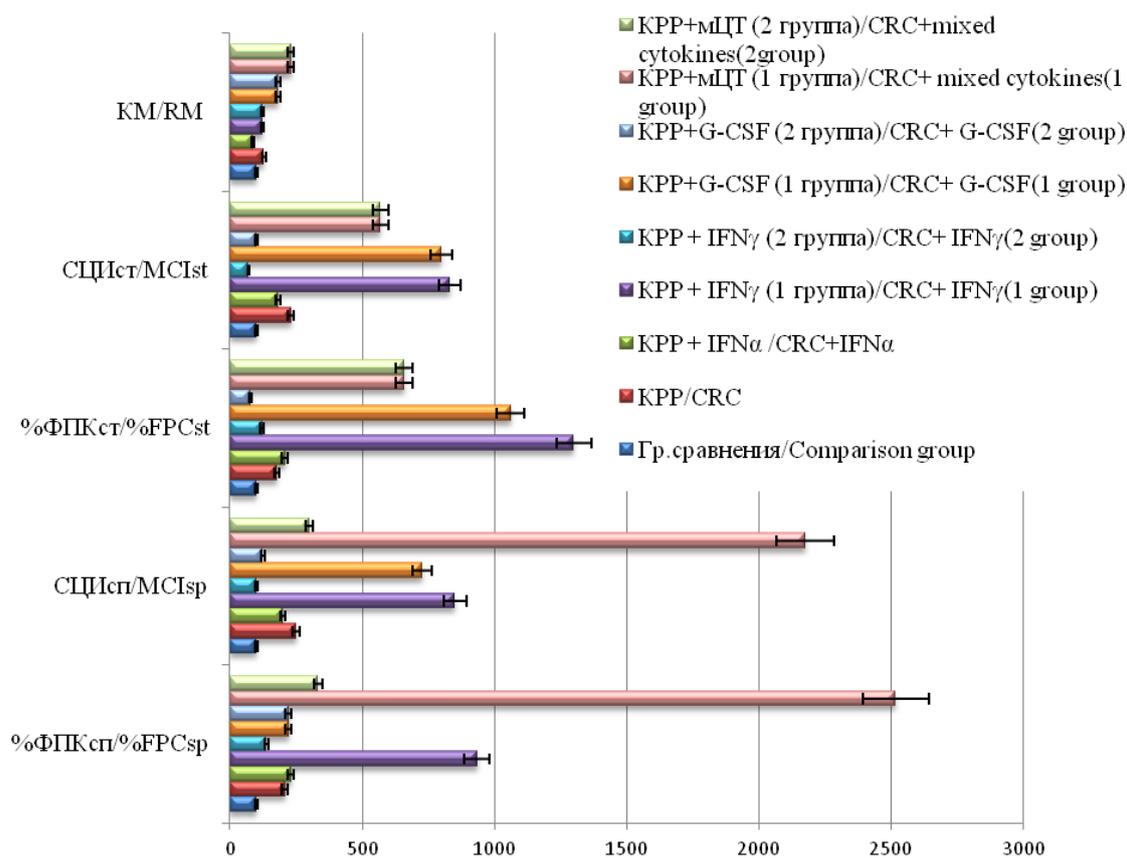


Рис. 5. Влияние цитокинов на активность кислородзависимой микробицидной системы (NADPH-оксидаза) нейтрофильных гранулоцитов в системе in vitro при колоректальном раке.

Fig. 5. Influence of cytokines on the activity of the oxygen-dependent microbicidal system (NADPH oxidase) of neutrophilic granulocytes in the in vitro system for colorectal cancer.

При оценке показателей % ФПК и СЦИ в NBT спонтанном – тесте показано, что уровень активности NADPH-оксидаз в НГ у пациентов с КРР после инкубации с мЦТ не изменился (Рис. 5). Влияние мЦТ приводило к изменению ответа на дополнительную нагрузку БАГ. Так, в 1-й группе отмечено значительное, более чем в 11 раз, повышение активности NADPH-оксидаз, регистрируемое как при

анализе % ФПК ($p < 0,05$), так и по СЦИ ($p < 0,05$); во 2-й группе пациентов выявлено отсутствие ответа на нагрузку БАГ (Рис. 5).

Инкубация НГ лиц, страдающих КРР с $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ позволила выявить разные эффекты на уровень КБ и их реализацию при дополнительной нагрузке БАГ (Таблица 4).

Таблица 4

Влияния $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ на микробицидную функцию НГ при колоректальном раке в системе *in vitro* (Ме (Q1; Q3))

Table 4

Effects of $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF and mCT on the microbicidal function of NG in colorectal cancer in an *in vitro* system (Me (Q1; Q3))

Группа group	КБсп CPsp	КБст CPst	КБст/КБсп CPsp/CPst	МПсп MPsp	МПст MPst	МПст/МПсп MPst/MPsp
Группа сравнения Comparison group	2,56 (2,36; 2,69)	1,78 (1,61; 2,11)	0,75 (0,70; 0,83)	2,26 (2,1; 2,41)	1,68 (1,4; 1,86)	0,74 (0,69; 0,81)
КРР CRC	2,14 (0,63; 1,70)	1,48 (1,29; 1,76)	0,68 (0,66; 0,70)	2,74 (2,6; 2,80)	2,27 (2,0; 2,30)	0,86 (0,85; 0,91)
КРР+ $IFN\alpha$ / CRC+ $IFN\alpha$	2,07 (2,01; 2,18)	1,88* (1,73; 2,0)	0,90* (0,78; 1,00)	2,46 (2,18; 2,79)	1,93 (1,61; 2,38)	0,85 (0,82; 0,98)
КРР+ $IFN\gamma$ / CRC+ $IFN\gamma$	1,97 (1,93; 2,19)	1,16* (0,45; 1,2)	0,59 (0,56; 0,74)	2,48* (2,4; 2,57)	2,28 (2,08; 2,5)	0,92* (0,88; 0,94)
КРР+G-CSF/ CRC+ G-CSF	1,91 (1,76; 2,09)	1,76 (1,61; 1,98)	0,92* (0,88; 1,10)	2,34* (2,2; 2,58)	1,90 (1,79; 2,01)	0,78 (0,74; 0,99)
КРР+мЦТ/ CRC+mCT	1,65 (1,41; 1,87)	0,93* (0,87; 1,21)	0,55* (0,50; 0,69)	2,23* (2,12; 2,4)	1,77* (1,62; 2,02)	0,78 (0,71; 1,09)

Примечание:* – различия показателей пациентов с колоректальным раком до инкубации и после инкубации с цитокинами статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Note: * – differences in indicators of patients with colorectal cancer before incubation and after incubation with cytokines are statistically substantiated with a type 1 error $p < 0.05$.

Так, выявлено, что инкубация с мЦТ, вызвала максимальное снижение уровня КБ ($p < 0,05$), в то же время значимых различий по моновлению $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF на уровень КБ не отмечалось ($p > 0,05$). После инкубации НГ с изучаемыми цитокинами нагрузка *S. aureus* вызывала дополнительный расход КБ. При этом наибольший эффект наблюдался при работе с мЦТ ($p < 0,05$), а наименьший – при $IFN\alpha$ ($p > 0,05$).

При этом оценка влияния цитокинов свидетельствовала о внутриклеточном и/или трансмембранном расходовании МП на фоне увеличения количества $CD62L^+CD63^+$ НГ.

В частности, инкубация НГ при КРР с $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ приводила к снижению активности МП ($p < 0,05$), более выраженному при мЦТ, при этом

нагрузка БАГ вызывала дополнительный расход МП во всех случаях ($p < 0,05$) (Таблица 4).

Таким образом, выявленное нарушение цитопатических свойств МП, КБ, NADPH-оксидаз при КРР и отсутствие ответа на воздействие регуляторных цитокинов может являться причиной снижения противоопухолевых свойств НГ.

В ходе проведенного исследования нами установлены особенности трансформации субпопуляций $CD62L^+CD63^-$ НГ и $CD62L^+CD63^+$ НГ ПК у пациентов с КРР, дающие представление о способности клетки к миграции, роллингу, реализации микробицидных функций.

Выявлено, что при КРР количество НГ субпопуляции $CD62L^+CD63^-$ было значимо ниже, но MFI

CD62L не отличался от значений условно-здоровых взрослых лиц. При этом в ПК отмечалось, увеличенное в 7,6 раз содержание активированной субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ с высоким уровнем MFI CD63 и низким MFI CD62L по отношению к показателям группы сравнения. Такой фенотип связан с транслокацией содержимого цитоплазматических гранул на клеточную поверхность, что может приводить с одной стороны к повышенной реактивности МП, а с другой стороны в сочетании со снижением MFI CD62L может быть сопряжено с процессом апоптоза [20]. У пациентов с КРР наблюдалась повышенная активность МП в спонтанном тесте по отношению к показателям в группе сравнения и отсутствие адекватного ответа в тесте с антигенной нагрузкой *S. aureus* in vitro.

Исследование влияния цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF, мЦТ на НГ пациентов с КРР позволило выявить однонаправленные активирующие эффекты: увеличилось количество субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ. При этом важно отметить, что уровень экспрессии MFI CD62L и MFI CD63 не менялся по сравнению с исходными значениями интактном контроле.

При этом инкубация с IFN α не влияла на активность МП, а IFN γ , G-CSF и мЦТ приводили к снижению активности МП, более значимому при мЦТ ($p < 0,05$).

В литературе отмечаются противоречивые данные о роли НГ с повышенной активностью МП в колоректальных опухолях [21–23]. В двух исследованиях показано, что инфильтрация опухоли МП⁺НГ коррелирует с воспалением толстой кишки, и что такие МП⁺НГ являются индикатором риска развития КРР [22]. В то же время позднее Droeser R.A. и соавторы [21] показали, что сильная инфильтрация опухоли CD15⁺МП⁺НГ была связана с лучшим прогнозом течения и исхода КРР [24].

Таким образом, установлены варианты трансформации субпопуляций CD62L⁺CD63⁺НГ, CD62L⁺CD63⁺НГ, выявлены дефекты реализации цитотоксического и биоцидного потенциала НГ, истощение резервных адаптационных возможностей и отсутствие адекватного ответа на дополнительную антигенную нагрузку и способности реагирования на регуляторные цитокины. По-видимому, возникновение таких дефектов функционирования НГ

приводит к снижению противоопухолевой активности НГ и способствует развитию КРР.

Выводы

1. При КРР отмечено значительное, в 7,6 раза, повышение количества НГ активированной субпопуляции CD62L⁺CD63⁺ с трансформированным фенотипом. Так, если у условно-здоровых субъектов только 4,4 % НГ были позитивны по CD62L и CD63 и имели фенотип CD62L^{dim}CD63^{dim}, то у пациентов с КРР 33,5 % НГ имели трансформированный фенотип CD62L^{dim}CD63^{bright}, который отличала высокая плотность экспрессии мембранного CD63.

2. В системе in vitro выявлены однонаправленные активирующие эффекты влияний цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF, мЦТ на НГ пациентов с КРР: отмечено еще более значимое увеличение в 1,7–2 раза активированной субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ по сравнению с уровнем, установленным у пациентов с КРР. При этом уровень плотности экспрессии молекул CD62L и CD63, оцениваемый по MFI, не менялся.

3. У пациентов с КРР выявлены дефекты спонтанной и индуцированной активности кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов микробицидной и цитотоксической активности НГ, ассоциированные с истощением резервных адаптационных возможностей НГ.

4. Отсутствие реагирования NADPH-оксидазы и КБ на инкубацию с цитокинами позволяют говорить о дефектах восприятия НГ воздействия регуляторных цитокинов.

5. Появление у пациентов с КРР субпопуляции НГ с трансформированным фенотипом CD62L^{dim}CD63^{bright} в сочетании с комбинированными функциональными дефектами НГ ассоциировано со снижением противоопухолевой активности НГ, о чем свидетельствует развитие на этом фоне опухолевого процесса в колоректальной зоне.

Библиографический список / References

1. *Cancer Research UK*. Cancer statistics. available at: www.cancerresearchuk.org. Access date: 10/08/2020.
2. Mantovani A., Romero P., Palucka A.K., Marincola F.M. Tumour immunity: effector response to tumor and role of the

- microenvironment. *Lancet*. 2008; 371:771–783.
3. McLean M.H., Murray G.I., Stewart K.N., Norrie G., Mayer C., Hold G.L., Thomson J., Fyfe H., Mowat N.A., Drew E.J., El-Omar M.E. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One*. 2011;6(1): e15366. doi:10.1371/journal.pone.0015366.
 4. Swierczak A., Mouchemore K.A., Hamilton J.A., Anderson R.L. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis*. 2015;34:735–751. doi:10.1007/s10555-015-9594-9
 5. Sionov R.V., Fridlender Z.G., Granot Z.. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2015;8:125–158. doi:10.1007/s12307-014-0147-5
 6. Coffelt S.B., Wellenstein M.D., de Visser K.E. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat. Rev. Cancer*. 2016;16:431–446. doi:10.1038/nrc.2016.52
 7. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G.. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017;222:82–88. doi:10.1016/j.imbio.2016.02.001
 8. Kabayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2008;13:2400–2407.
 9. Khajah M., Millen B., Cara D.C., Waterhouse C., Mc Cafferty D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011; 89 (6):945–953.
 10. Dumitru C.A., Lang S., Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: Mechanisms and consequences for tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2013;23:141–148.
 11. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017;222 (1):82–88.
 12. Zhang X., Zhang W., Yuan X., Fu M., Qian H., Xu W. Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *International journal of oncology*. 2016; 49(3):857–867.
 13. Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., Freeman B.A., Daiber A., Gehling U.M., Brümmer J., Rudolph V., Münzel T., Heitzer T., Meinertz T., Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102 (2):431–436.
 14. Mantovani A. The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*. 2009;8:173–174.
 15. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms clinical correlates. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(5): 379–390.
 16. Lin A., Lore K. Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. *Frontiers in Immunology*. 2017;11. doi:10.3389/fimmu.2017.01781
 17. Dallegri F., Ottonello L., Ballesterro A., Patrizia Dapino, F. Ferrando, F. Patrone, C. Sacchetti Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen. *Inflammation*. 1991; 1(15):15–30.
 18. Lai X., Gu Q., Zhou X., Feng W., Lin X., He Y., Cao J., Liu P., Zhang H., Zheng X. Decreased expression of CD63 tetraspanin protein predicts elevated malignant potential in human esophageal cancer. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4245–4251. DOI: 10.3892/ol.2017.6023.
 19. Liu W.H., Li X., Zhu X.L., Hou M.L., Zhao W. CD63 inhibits the cell migration and invasion ability of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;(6): 9033–9042. DOI: 10.3892 / ol.2018.8499.
 20. Beinert T., Munzing S., Possinger K., Krombach F. Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 67:369–373.
 21. Drosner R.A., Hirt C., Eppenberger-Castori S., Zlobec I., Viehl C.T., Frey D.M., Nebiker C.A., Rosso R., Zuber M., Amicarella F. High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS One*. 2013; 8: e64814.
 22. Roncucci L., Mora E., Mariani F., Bursi S., Pezzi A., Rossi G., Pedroni M., Luppi D., Santoro L., Monni S. Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17: 2291–2297.
 23. Rao H.L., Chen J.W., Li M., Xiao Y.B., Fu J., Zeng Y.X., Cai M.Y., Xie D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One*. 2012;7: e30806
 24. Gustafson M.P., Lin Y., Maas M.L., Van Keulen V.P., Johnston P.B., Peikert T., Gastineau D.A., Dietz A.B. A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. *PLoS One*. 2015; 10: e0121546.

Ответственный за переписку: Чудилова Галина Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 350063, Россия, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4. E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Чудилова Г.А. SPIN: 2092–6412; ORCID: 0000–0001–8005–9325
 Нестерова И.В. SPIN: 4714–2488; ORCID: 0000–0002–5339–4504
 Ковалева С.В. SPIN: 8289–5342; ORCID: 0000–0002–9604–5806
 Ломтатидзе Л.В. SPIN: 2060–9316; ORCID: 0000–0002–7041–7106

Corresponding author: Chudilova G.A. – Associate Professor, PhD, Kuban State Medical University, 350063, Russia, Krasnodar, Mitrophan Sedina str., 4. E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Chudilova G.A. ORCID: 0000–0001–8005–9325
 Nesterova I.V. ORCID: 0000–0002–5339–4504
 Kovaleva S.V. ORCID: 0000–0002–9604–5806
 Lomtadidze L.V. ORCID: 0000–0002–7041–7106

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-315-324

Комплексное воздействие кофеина и диоксидина
в тесте Порсолта на поведенческие реакции мышейН.А. Дурнова, А.Ю. Каретникова, Д.С. Исаев, А.Р. Кланцатая,
А.С. ШереметьеваСаратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского, г. Саратов, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* В свете популяризации употребления кофеинсодержащих продуктов открытым остается вопрос о сочетанном применении кофеина с веществами, проявляющими токсический эффект. Также недостаточно изучены дозы кофеина, оказывающие выраженный антидепрессантный эффект. *Целью исследования* являлось изучение влияния многократного введения кофеина и диоксидина на поведенческие реакции мышей в тесте Порсолта. *Материалы и методы.* Эксперимент был проведен на 36 беспородных мышках-самцах, разделенных на 6 групп. Опытные группы на протяжении 15 дней исследования получали кофеин в дозе 40 мг/кг (первая) или 100 мг/кг (вторая), диоксидин в дозе 200 мг/кг (третья), совместно кофеин 40 мг/кг или 100 мг/кг и диоксидин (четвертая и пятая группы соответственно). Животным группы контроля вводили физиологический раствор. Для изучения поведения проводили тест Порсолта, оценивая следующие показатели на 1-е, 8-е и 15-е сутки эксперимента: суммарное время иммобилизации, активного плавания, климбинга, количество актов груминга и отряхивания. *Результаты.* Введение кофеина в дозе 40 мг/кг вызывало увеличение времени активного плавания и снижение длительности иммобилизации на 8-е и 15-е сутки. При использовании кофеина в дозе 100 мг/кг было отмечено увеличение времени активного плавания при однократном воздействии, при продолжительности эксперимента 8–15 суток наблюдалось увеличение длительности иммобилизации. Диоксидин вызывал значительное снижение времени активного плавания и увеличение продолжительности иммобилизации на протяжении всех дней эксперимента. Сочетанное применение кофеина (40 мг/кг и 100 мг/кг) и диоксидина на 1-е сутки приводило к снижению иммобилизации и времени активного плавания. В обеих группах к 15-м суткам наблюдалась 100 % смертность животных. *Выводы.* Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии антидепрессантного эффекта у кофеина в дозе 40 мг/кг на 8-е и 15-е сутки эксперимента и отсутствии этого влияния у кофеина в дозе 100 мг/кг при продолжительности введения 8–15 суток. Применение диоксидина приводило к отсутствию антидепрессивной активности и наличию обратного эффекта. Совместное введение кофеина (40 мг/кг и 100 мг/кг) и диоксидина приводило к 100 % смертности опытных групп к 15-м суткам эксперимента.

Ключевые слова: кофеин, диоксидин, тест Порсолта, поведенческие реакции

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования – все авторы; проведение эксперимента и получение данных – А.Ю. Каретникова, Д.С. Исаев, А.Р. Кланцатая; обработка данных и написание статьи – Н.А. Дурнова, А.С. Шереметьева,

© Дурнова Н.А., Каретникова А.Ю., Исаев Д.С., Кланцатая А.Р., Шереметьева А.С., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

А.Ю. Каретникова; анализ и интерпретация результатов – Н.А. Дурнова, А.С. Шереметьева, А.Ю. Каретникова; утверждение рукописи для публикации – Н.А. Дурнова.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Дурнова Н.А., Каретникова А.Ю., Исаев Д.С., Кланцатая А.Р., Шереметьева А.С. Комплексное воздействие кофеина и диоксидина в тесте Порсолта на поведенческие реакции мышей // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 315–324. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-315-324

Complex effect of caffeine and dioxidine on behavioral responses in mice in Porsolt test

N.A. Durnova, A. Yu. Karetnikova, D.S. Isaev, A.R. Klantsataya,
A.S. Sheremetyeva

Saratov State Medical University, Saratov, Russian Federation

Abstract. Relevance. In light of the popularization of the use of caffeine-containing products, the question of the combined use of caffeine with substances exhibiting a toxic effect remains open. The doses of caffeine, which have a pronounced antidepressant effect, are also insufficiently studied. *The aim of the study* was to study the effect of repeated administration of caffeine and dioxidine on the behavioral responses of mice in the Porsolt test. *Materials and methods.* The experiment was carried out on 36 outbred male mice, divided into 6 groups. Experimental groups for 15 days of the study received caffeine at a dose of 40 mg/kg (first) or 100 mg/kg (second), dioxidine at a dose of 200 mg/kg (third), together with caffeine 40 mg/kg or 100 mg/kg, and dioxidine (fourth and fifth groups, respectively). The animals of the control group were injected with saline. To study the behavior, the Porsolt test was carried out, evaluating the following indicators on the 1st, 8th and 15th days of the experiment: the total time of immobilization, active swimming, climb, the number of grooming and shaking off acts. *Results.* The administration of caffeine at a dose of 40 mg/kg caused an increase in the time of active swimming and a decrease in the duration of immobilization on the 8th and 15th days. When caffeine was used at a dose of 100 mg/kg, an increase in the time of active swimming was noted with a single exposure, with an experiment duration of 8–15 days, an increase in the duration of immobilization was observed. Dioxidine caused a significant decrease in the time of active swimming and an increase in the duration of immobilization during all days of the experiment. The combined use of caffeine (40 mg/kg and 100 mg/kg) and dioxidine on the 1st day led to a decrease in immobilization and the time of active swimming. In both groups, 100 % animal mortality was observed by the 15th day. *Conclusion.* The results of the study indicate the presence of an antidepressant effect in caffeine at a dose of 40 mg/kg on the 8th and 15th days of the experiment and the absence of this effect in caffeine at a dose of 100 mg/kg with a duration of administration of 8–15 days. The use of dioxidine led to the absence of antidepressant activity and the presence of the opposite effect. The combined administration of caffeine (40 mg/kg and 100 mg/kg) and dioxidine led to 100 % mortality in the experimental groups by the 15th day of the experiment.

Key words: caffeine, dioxidine, Porsolt's test, behavioral reactions

Author contributions. Concept and design of the study – all authors; experiment and data acquisition – A. Yu. Karetnikova, A.R. Klantsataya, D.S. Isaev; data processing and article writing – N.A. Durnova, A.S. Sheremetyeva, A. Yu. Karetnikova; analysis and interpretation of results – N.A. Durnova, A.S. Sheremetyeva, A. Yu. Karetnikova; approval of the manuscript for publication – N.A. Durnova.

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

Received 14.08. 2020. Accepted 11.09.2020

For citation: Durnova N.A., Karetnikova A. Yu., Isaev D.S., Klantsataya A.R., Sheremetyeva A.S. Complex effect of caffeine and dioxidine on behavioral responses in mice in Porsolt test. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):315–324. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-315-324

Введение

По оценкам ВОЗ, во всем мире от депрессии страдает более 264 миллионов человек из всех возрастных групп [1]. Депрессия – психическое расстройство, сопровождающееся комплексом симптомов, которые трудно полностью воспроизвести на лабораторных животных. Однако депрессия, как и многие психические расстройства, состоит из эндофенотипов, которые могут быть независимо воспроизведены и исследованы на моделях у животных. Одним из эндофенотипов в моделях депрессии является поведение отчаяния, которое может быть оценено в тесте принудительного плавания [2].

Кофеин традиционно является одним из общеизвестных психостимуляторов, тем не менее, некоторые исследования показывают, что кофеин в малых дозах оказывает стимулирующее воздействие на нервную систему, а при введении больших доз вызывает ее угнетение [3]. Кроме того, в ряде экспериментов кофеин демонстрирует антидепрессивную активность [4–7]. Несмотря на то, что эффекты кофеина многократно изучались, данные исследований зачастую оказывались противоречивыми, из-за чего сохраняется неоднозначность в полученных результатах [8].

Так, в настоящее время одним из перспективных аспектов изучения эффектов кофеина является оценка его влияния на поведенческие реакции животных [9, 10]. Имеются данные об исследовании на лабораторных крысах, в котором с помощью разнообразных экспериментальных методов доза 40 мг/кг определена как наиболее эффективно влияющая среди исследуемых доз (20, 40 и 80 мг/кг) на поведение лабораторных животных [11]. В другом исследовании при однократном введении кофеина

крысам в дозе 10 мг/кг отмечено увеличение двигательной активности экспериментальных животных, а введение кофеина в дозе 100 мг/кг не приводило к ее изменению [12].

Не менее важным в свете популяризации употребления кофеинсодержащих продуктов [13] является вопрос о сочетанном влиянии кофеина с другими веществами. Например, ранее в тестах принудительного плавания и подвешивания мышей за хвост показано, что хроническое введение низких доз кофеина (5 мг/кг) в течение 14 суток и его последующая отмена на 15 сутки и введение на 15 сутки неэффективных доз селективных ингибиторов обратного захвата серотонина усиливают их антидепрессантную активность [14]. Но изучение взаимодействия кофеина с веществами, способными проявлять токсический эффект, ранее не проводилось. В доклинических исследованиях в качестве вещества с доказанным цитотоксическим и мутагенным действием нередко используется диоксидин [15]. В то время как его влияние на поведенческие реакции животных, как при отдельном воздействии, так и при одновременном введении с другими веществами, исследовано не было.

Цель исследования: изучить влияние многократного введения кофеина и диоксидина на поведенческие реакции мышей в тесте Порсолта.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование было проведено на 36 беспородных мышках-самцах возрастом 2 месяца и массой 35–40 г. Животные содержались в условиях вивария при постоянной температуре и влажности воздуха с 12-часовым световым циклом со свободным доступом к воде и пище.

Все эксперименты проводились с соблюдением правил лабораторной практики (приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н) в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990), Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция 2000 г.), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте и других научных целях (Страсбург, 1986) ETS N123 и с одобрения этического комитета ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им В.И. Разумовского Минздрава России (протокол № 3 от 06.11.2018).

Лабораторные животные были разделены на шесть равных групп, по 6 особей в каждой: контрольную и пять опытных. В течение 15 дней исследования мыши опытных групп ежедневно получали внутривенно кофеин: первая в дозе 40 мг/кг, вторая – 100 мг/кг. Животным третьей опытной группы внутривенно вводили диоксидин в количестве 200 мг/кг [16]. Четвертой и пятой группе совместно вводили кофеин (40 мг/кг или 100 мг/кг) и диоксидин (200 мг/кг). Контрольной группе внутривенно инъецировали физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Для изучения поведенческих реакций животных использовали тест принудительного плавания Порсолта [17], который проводили на 1-е, 8-е и 15-е сутки эксперимента. Проводили видеофиксацию плавания каждого животного, на основании которой оценивали следующие параметры: суммарное время иммобилизации, активного плавания, климбинга, количество актов груминга и отряхивания. Моментом окончания теста считали

погружение животного под водное зеркало. При использовании данной методики основными определяемыми значениями являются длительность активного плавания и иммобилизации. Причем продолжительность неподвижности является достоверным показателем депрессивного состояния животного [18].

Во время проведения эксперимента на 5-е сутки у животных всех групп были взяты образцы крови для цитогенетического анализа (часть III). На 15-е сутки мышей выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом для забора крови и исследования биохимических показателей (часть II).

Полученные результаты обрабатывали при помощи прикладных статистических программ «STATISTICA 10» (StatSoft®, США). Для каждого исследуемого параметра вычисляли медиану (Me) и межквартильный размах. Значимыми считались изменения при $p < 0,05$. Достоверность полученных значений оценивали при помощи U-критерия Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования установлено, что после введения кофеина и диоксидаина происходят изменения в поведенческих реакциях животных (время плавания и время иммобилизации), которые зависят от продолжительности проведения эксперимента и существенно отличаются от контрольной группы (табл. 1–3). Вместе с тем по количеству актов груминга и отряхивания все опытные группы на протяжении всех дней исследования значимо не изменялись, как по отношению к контролю, так и между собой.

Таблица 1

Показатели поведенческих реакций белых мышей при применении теста Порсолта при многократном введении кофеина и диоксидина на 1-е сутки эксперимента

Table 1

Indicators of behavioral reactions of white mice using the Porsolt test with repeated administration of caffeine and dioxidine on the 1st day of the experiment

Показатели/ Indicators	Группы животных / Groups of animals					
	Контроль/ Control	Первая опытная (Кофеин 40 мг/кг)/ The first experimental (Caffeine 40 mg/kg)	Вторая опытная (Кофеин 100 мг/кг)/ Second experimental (Caffeine 100 mg/kg)	Третья опытная (Диоксидин 200 мг/кг)/ Third experimental (Dioxidine 200 mg/kg)	Четвертая опытная (Кофеин 40 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг)/ The fourth experimental (Caffeine 40 mg/ kg + Dioxidine 200 mg/kg)	Пятая опытная (Кофеин 100 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг)/ Fifth experimental (Caffeine 100 mg/ kg + Dioxidine 200 mg/kg)
Активное плавание (с)/ Active swimming (s)	1009 (644; 1024)	734 (675; 777) $p_1=0,371$	1076 (1066; 1123) $p_1=0,003$ $p_3=0,003$	580 (350; 907) $p_1=0,432$ $p_3=0,371$ $p_4=0,1$	817 (742; 918) $p_1=0,520$ $p_2=0,174$ $p_3=0,030$	659 (632; 906) $p_1=0,830$ $p_2=0,432$ $p_4=0,432$
Иммобильность (с)/ Immobility (s)	78 (69; 110)	0 (0; 7) $p_1=0,002$	6 (2; 101) $p_1=0,197$ $p_3=0,239$	533 (326; 707) $p_1=0,224$ $p_3=0,001$ $p_4=0,008$	0 (0; 18) $p_1=0,012$ $p_2=0,002$ $p_3=0,060$	45 (8; 82) $p_1=0,022$ $p_2=0,003$ $p_4=0,025$
Климбинг (с)/ Climbing (s)	140 (77; 178)	58 (16; 77) $p_1=0,029$	102 (64; 121) $p_1=0,284$ $p_3=0,074$	139 (27; 155) $p_1=0,721$ $p_3=0,097$ $p_4=0,284$	250 (176; 365) $p_1=0,520$ $p_2=0,018$ $p_3=0,005$	139 (103; 196) $p_1=0,1$ $p_2=0,520$ $p_4=0,018$
Груминг (кол-во)/ Grooming (qty)	15 (2; 19)	7 (5; 9) $p_1=0,701$	7 (0; 25) $p_1=0,518$ $p_3=0,1$	7 (4; 10) $p_1=0,025$ $p_3=0,797$ $p_4=0,885$	0 (0; 2) $p_1=0,886$ $p_2=0,013$ $p_3=0,326$	1 (0; 2) $p_1=0,035$ $p_2=0,002$ $p_4=0,041$
Отряхивание (кол-во)/ Shaking off (qty)	11 (3; 14)	7 (0; 10) $p_1=0,123$	10 (0; 18) $p_1=0,886$ $p_3=0,514$	17 (5; 23) $p_1=0,017$ $p_3=0,063$ $p_4=0,281$	0 (0; 4) $p_1=0,351$ $p_2=0,014$ $p_3=0,244$	2 (1; 3) $p_1=0,025$ $p_2=0,005$ $p_4=0,470$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 – по сравнению с контролем, p_2 – по сравнению с третьей опытной группой, p_3 – по сравнению с первой опытной группой, p_4 – по сравнению со второй опытной группой.

Notes: median, upper and lower quartiles are given in each case; p_1 – compared with the control, p_2 – compared with the third experimental group, p_3 – compared with the first experimental group, p_4 – compared with the second experimental group.

У первой опытной группы, получавшей кофеин в дозе 40 мг/кг, на 1-е сутки эксперимента наблюдалось достоверное снижение климбинга на 58,5 % и отсутствие времени иммобилизации. Продолжительность активного плавания статистически

значимо не изменялась по сравнению контролем (таблица 1). При дальнейшем введении кофеина в течение 8-ми суток было отмечено достоверное увеличение времени активного плавания на 50,3 % и снижение продолжительности иммобилизации

на 93 %. Значения климбинга снижались недостоверно (таблица 2). На 15-е сутки исследования происходило достоверное увеличение времени актив-

ного плавания животных на 17 %. Статистически значимых изменений в показателях иммобилизации и климбинга выявлено не было (таблица 3).

Таблица 2

Показатели поведенческих реакций белых мышей при применении теста Порсолта при многократном введении кофеина и диоксидина на 8-е сутки эксперимента

Table 2

Indicators of behavioral reactions of white mice using the Porsolt test with repeated administration of caffeine and dioxidine on the 8th day of the experiment

Показатели/ Indicators	Группы животных / Groups of animals					
	Контроль/ Control	Первая опытная (Кофеин 40 мг/кг)/ The first experimental (Caffeine 40 mg/kg)	Вторая опытная (Кофеин 100 мг/кг)/ Second experimental (Caffeine 100 mg/kg)	Третья опытная (Диоксидин 200 мг/кг)/ Third experimental (Dioxidine 200 mg/ kg)	Четвертая опытная (Кофеин 40 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг)/ The fourth experimental (Caffeine 40 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg)	Пятая опытная (Кофеин 100 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг)/ Fifth experimental (Caffeine 100 mg/ kg + Dioxidine 200 mg/kg)
Активное плавание (с)/ Active swimming (s)	797 (684; 869)	1198 (1067; 1217) $p_1=0,008$	739 (702; 776) $p_1=0,263$ $p_3=0,003$	744 (601; 835) $p_1=0,481$ $p_3=0,005$ $p_4=0,869$	1007 (441; 1024) $p_1=0,604$ $p_2=0,378$ $p_3=0,371$	728 (393; 1063) $p_1=0,593$ $p_2=0,685$ $p_4=0,011$
Иммобильность (с)/ Immobility (s)	350 (207; 466)	24 (4; 30) $p_1=0,008$	72 (61; 83) $p_1=0,022$ $p_3=0,003$	519 (299; 648) $p_1=0,279$ $p_3=0,003$ $p_4=0,004$	263 (177; 446) $p_1=0,605$ $p_2=0,173$ $p_3=0,004$	474 (137; 810) $p_1=0,592$ $p_2=0,688$ $p_4=0,003$
Климбинг (с)/ Climbing (s)	24 (0; 79)	13 (3; 62) $p_1=0,943$	2 (0; 4) $p_1=0,080$ $p_3=0,432$	29 (6; 41) $p_1=0,887$ $p_3=0,943$ $p_4=0,018$	0 (0; 4) $p_1=0,071$ $p_2=0,027$ $p_3=0,928$	0 (0; 0) $p_1=0,080$ $p_2=0,018$ $p_4=0,418$
Груминг (кол-во)/ Grooming (qty)	0 (0; 3)	5 (1; 7) $p_1=0,141$	0 (0; 0) $p_1=0,049$ $p_3=0,006$	3 (0; 14) $p_1=0,258$ $p_3=0,829$ $p_4=0,028$	0 (0; 0) $p_1=0,334$ $p_2=0,073$ $p_3=0,405$	3 (0; 6) $p_1=0,563$ $p_2=0,676$ $p_4=0,058$
Отряхивание (кол-во)/ Shaking off (qty)	8 (3; 12)	5 (3; 7) $p_1=0,249$	0 (0; 0) $p_1<0,001$ $p_3=0,006$	4 (2; 10) $p_1=0,370$ $p_3=0,885$ $p_4=0,009$	1 (0; 3) $p_1=0,006$ $p_2=0,118$ $p_3=0,073$	0 (0; 0) $p_1=0,002$ $p_2=0,009$ $p_4=0,006$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 – по сравнению с контролем, p_2 – по сравнению с третьей опытной группой, p_3 – по сравнению с первой опытной группой, p_4 – по сравнению со второй опытной группой.

Notes: median, upper and lower quartiles are given in each case; p_1 – compared with the control, p_2 – compared with the third experimental group, p_3 – compared with the first experimental group, p_4 – compared with the second experimental group.

Таблица 3

Показатели поведенческих реакций белых мышей при применении теста Порсолта при многократном введении кофеина и диоксидина на 15-е сутки эксперимента

Table 3

Indicators of behavioral reactions of white mice using the Porsolt test with repeated administration of caffeine and dioxidine on the 15th day of the experiment

Показатели/ Indicators	Группы животных / Groups of animals			
	Контроль/ Control	Первая опытная (Кофеин 40 мг/кг)/ The first experimental (Caffeine 40 mg/kg)	Вторая опытная (Кофеин 100 мг/кг)/ Second experimental (Caffeine 100 mg/kg)	Третья опытная (Диоксидин 200 мг/кг)/ Third experimental (Dioxidine 200 mg/kg)
Активное плавание (с)/ Active swimming (s)	958 (801; 1073)	1121 (1069; 1157) $p_1=0,038$	724 (679; 787) $p_1=0,1$ $p_3=0,005$	612 (582; 959) $p_1=0,248$ $p_3=0,013$ $p_4=0,376$
Иммобильность (с)/ Immobility (s)	70 (25; 131)	16 (12; 20) $p_1=0,074$	342 (226; 399) $p_1=0,012$ $p_3=0,004$	540 (61; 551) $p_1=0,029$ $p_3=0,004$ $p_4=0,375$
Климбинг (с)/ Climbing (s)	82 (6; 291)	32 (21; 59) $p_1=0,351$	97 (78; 109) $p_1=0,830$ $p_3=0,013$	62 (32; 66) $p_1=0,416$ $p_3=0,566$ $p_4=0,029$
Груминг (кол-во)/ Grooming (qty)	12 (4; 21)	8 (5; 13) $p_1=0,829$	0 (0; 0) $p_1=0,002$ $p_3=0,003$	26 (17; 61) $p_1=0,029$ $p_3=0,004$ $p_4=0,003$
Отряхивание (кол-во)/ Shaking off (qty)	7 (2; 8)	5 (5; 6) $p_1=0,507$	0 (0; 0) $p_1=0,002$ $p_3=0,002$	10 (7; 14) $p_1=0,043$ $p_3=0,004$ $p_4=0,002$

Примечания: в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 – по сравнению с контролем, p_3 – по сравнению с первой опытной группой, p_4 – по сравнению со второй опытной группой.

Notes: median, upper and lower quartiles are given in each case; p_1 – compared with the control, p_3 – compared with the first experimental group, p_4 – compared with the second experimental group.

Животные второй опытной группы, получавшие кофеин в дозе 100 мг/кг, на 1-е сутки эксперимента демонстрировали незначительное увеличение времени активного плавания (на 6,7 %). В то же время показатели иммобилизации и климбинга снижались недостоверно (таблица 1). При увеличении продолжительности воздействия кофеина к 8-м суткам наблюдалось достоверное снижение времени иммобилизации (на 79,4 %) (таблица 2). Изменения в значениях активного плавания и климбинга статистической значимости не имели. Однако на 15-е сутки эксперимента было отмечено значительное увеличение продолжительности времени иммобили-

зации, этот показатель превышал контрольные значения в 4 раза (таблица 3). Время активного плавания и климбинга статистически значимо не изменялось.

У третьей опытной группы (получавшей диоксидин) на 1-е и 8-е сутки эксперимента статистически значимых отличий отмечено не было (табл. 1 и 2). При дальнейшем введении диоксидина к 15-м суткам наблюдалось увеличение уровня иммобилизации, более чем в 7 раз превышающее контрольные значения. Время климбинга и активного плавания снижалось недостоверно (таблица 3).

У животных четвертой (совместное введение кофеина в дозе 40 мг/кг и диоксидина) и пятой (со-

вместное введение кофеина в дозе 100 мг/кг и диоксида) опытных групп на 1-е сутки эксперимента установлено достоверное снижение длительности иммобилизации, а также наблюдалась тенденция к снижению времени активного плавания по сравнению с контрольной группой (таблица 1). На 8-е сутки эксперимента статистически значимых отличий отмечено не было (таблица 2). В обеих группах к 15-м суткам наблюдалась 100 % смертность животных.

Результаты проведенного исследования подтверждают антидепрессантные эффекты кофеина, при этом к 15-м суткам более выраженные антидепрессивные свойства отмечены для животных, получавших кофеин в дозе 40 мг/кг, чем в дозе 100 мг/кг.

Введение животным кофеина в дозе 40 мг/кг (первая опытная группа) на 1-е сутки исследования приводило к снижению продолжительности активного плавания только на уровне тенденции, но при этом отсутствовало время иммобилизации. При более длительном воздействии к 8-м и 15-м суткам эксперимента наблюдалось увеличение времени активного плавания и снижение иммобилизации, что позволяет считать кофеин в дозе 40 мг/кг веществом с выраженной антидепрессантной активностью. Подобные изменения согласуются с ранее представленными данными, в которых указанная доза кофеина оказывала наиболее значимый эффект по сравнению с вводимыми дозами 20 мг/кг или 80 мг/кг [11].

При использовании кофеина в дозе 100 мг/кг (вторая опытная группа) отмечалась лишь незначительная степень выраженности антидепрессантной активности на 1-е сутки эксперимента – увеличивалась продолжительность активного плавания. К 8-м суткам эксперимента время активного плавания статистически значимо не отличалось от показателей контроля, однако продолжительность иммобилизации была значительно ниже. При сравнении второй опытной группы с первой наблюдалось снижение времени активного плавания и увеличение длительности иммобилизации. На 15-е сутки исследования отмечалось уменьшение времени активного плавания и увеличение времени иммобилизации по сравнению с контрольными значениями и группой, получавшей кофеин в дозе 40 мг/кг, что позволяет сказать об отсутствии у кофеина в данной

дозировке выраженного антидепрессивного эффекта при применении более 8–15 дней [19, 20].

Диоксидин, который получали животные третьей опытной группы, вызывал значительное снижение времени активного плавания и увеличение продолжительности иммобилизации по сравнению с группой контроля, первой и второй опытными группами на протяжении всех дней эксперимента. Изменение указанных значений говорит об ожидаемом отсутствии у диоксида антидепрессантной активности и проявлении обратного эффекта, вероятно, обусловленного токсическим действием, вызванным многократным внутрибрюшинным введением этого вещества [21].

Совместное введение кофеина в дозе 40 мг/кг и диоксида (четвертая опытная группа) на 1-е сутки эксперимента приводило к увеличению продолжительности активного плавания и отсутствию времени иммобилизации по сравнению с первой и третьей опытными группами. При этом у четвертой экспериментальной группы отмечалось снижение времени плавания на уровне тенденции и отсутствие иммобилизации по отношению к контролю. На 8-е сутки выявлено увеличение длительности активного плавания, а также снижение времени иммобилизации по сравнению с контрольной группой и третьей опытной только на уровне тенденции. Однако по сравнению со второй группой наблюдалось увеличение иммобилизации. Отмеченные изменения показателей, вероятно, обусловлены протекторным действием кофеина, который на протяжении 8-ми суток исследования способен снижать негативное влияние диоксида. Но при увеличении продолжительности воздействия до 15-х суток наблюдалась 100 % смертность животных этой группы.

При оценке изменений, выявленных у мышей пятой опытной группы, получавшей совместно кофеин в дозе 100 мг/кг и диоксидин, на 1-е сутки исследования отмечалось снижение иммобилизации по сравнению с контролем. Однако по отношению ко второй опытной группе был установлен рост иммобилизации. При сравнении с третьей опытной группой отмечалось увеличение длительности активного плавания на уровне тенденции и снижение иммобилизации. К 8-м суткам эксперимента было

выявлено значительное снижение времени активного плавания по сравнению со всеми исследуемыми группами. При увеличении длительности эксперимента до 15-х суток наблюдалась 100 % смертность животных, как и в четвертой группе.

Выводы

1. По результатам проведенного исследования можно утверждать, что применение кофеина в дозе 40 мг/кг оказывает антидепрессивный эффект.

2. Обнаруженные изменения в динамике показателей при использовании кофеина в дозе 100 мг/кг доказывают, что при продолжительности его введения 8–15 суток антидепрессивное влияние отсутствует, при этом был отмечен незначительный стимулирующий эффект при однократном воздействии (увеличивалось время активного плавания).

3. Диоксидин в дозе 200 мг/кг показал отсутствие антидепрессивной активности и наличие обратного эффекта (увеличение времени иммобилизации).

4. Совместное введение диоксидина и кофеина (и в дозе 40 мг/кг, и в дозе 100 мг/кг) к 15-м суткам эксперимента приводило к 100 % смертности животных опытных групп.

Библиографический список

1. Depression. World Health Organization. [дата обращения: 30.01.2020]. Доступ по ссылке: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
2. Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. Поведенческие экспериментальные модели депрессии. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2017. № 3. С. 14–19.
3. Peters J.M. Factors affecting caffeine toxicity: a review of the literature. The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs. 1967. Vol. 7. № 3. P. 131–141.
4. Pham N.M., Nanri A., Kurotani K., Kuwahara K., Kume A., Sato M., et al. Green tea and coffee consumption is inversely associated with depressive symptoms in a Japanese working population. Public Health Nutrition. 2014. Vol. 17. № 3. P. 625–633. doi: 10.1017/S1368980013000360
5. Park R.J., Moon J.D. Coffee and depression in Korea: the fifth Korean National Health and nutrition examination survey. European Journal of Clinical Nutrition. 2015. Vol. 69. № 4. P. 501–504. doi: 10.1038/ejcn.2014.247
6. Проскурякова Т.В., Гришин М.Э. Кофеин и психическое здоровье // Психическое здоровье. 2016. Т. 14. № 10. С. 76–82.
7. Lucas M., O'Reilly E.J., Pan A., Mirzaei F., Willett W.S., Okereke O.I., et al. Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: results from three prospective cohorts of American adults. The World Journal of Biological Psychiatry. 2014. Vol. 15. № 5. P. 377–386. doi: 10.3109/15622975.2013.795243
8. James J.E. Are coffee's alleged health protective effects real or artifact? The enduring disjunction between relevant experimental and observational evidence. Journal of Psychopharmacology. 2018. Vol. 32. № 8. P. 850–854. doi: 10.1177/0269881118771780
9. Башкатова В.Г., Назарова Г.А., Алексеева Е.В. Влияние внутриутробного введения кофеина на поведение крысят в тесте: приподнятый крестообразный Лабиринт. Проблемы современной науки и образования. 2016. № 40 (82). С. 15–17.
10. Маркова Е.В., Княжева М.А., Савкин И.В., Тихонова М.А., Амтиславская Т.Г. Купирование поведенческих паттернов депрессивно-подобного состояния у экспериментальных животных трансплантацией модулированных психоактивным веществом иммунных клеток. Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № 5. С. 48–49.
11. Арушанян Э.Б., Попов А.В. Особенности временной организации поведенческого ответа крыс на кофеин. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005. Т. 68. № 1. С. 10–12.
12. Башкатова В.Г., Алексеева Е.В., Богданова Н.Г., Назарова Г.А. Влияние острого введения разных доз кофеина на поведенческие показатели взрослых крыс. Наркология. 2017. Т. 16. № 12. С. 9–13.
13. Калинин А.Я. Кофеин-друг или враг? Компетентность. 2014. Т. 9. № 120–121. С. 43.
14. Szopa A., Doboszewskab U., Herbertc M., Wosko S., Wysład E., Swiqdera K., et al. Chronic treatment with caffeine and its withdrawal modify the antidepressant-like activity of selective serotonin reuptake inhibitors in the forced swim and tail suspension tests in mice. Effects on Comt, Slc6a15 and Adora1 gene expression. Toxicology and Applied Pharmacology. 2017. Vol. 337. P. 95–103. doi: 10.1016/j.taap.2017.10.020
15. Курчатова М.Н., Дурнова Н.А., Полуконова Н.В. Влияние экстрактов, содержащих биофлавоноиды, на индукцию микроядер диоксидином в эритроцитах крови беспородных белых мышей. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. № 2. С. 58–65.
16. Дурнев А.Д., Кулакова А.В., Жанатаев А.К., Оганесянц Л.А. Оценка цитогенетической и мутаген-модифицирующей активности кофеина в клетках костного мозга мышей. Гигиена и санитария. 2015. Т. 94. № 3. С. 106–110.
17. Porsolt R.D., Bertin A., Blavet N., Deniel M., Jalfre M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. European Journal of Pharmacology. 1979. Vol. 57. № 2–3. P. 201–210.
18. Ковалева М.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Горячева М.А. Применение теста «принудительное плавание» при проведении доклинических исследований. Международный вестник ветеринарии. 2015. № 4. С. 90–95.
19. Fisone G., Borgkvist A., Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS). 2004. Vol. 61. № 7–8. P. 857–872.
20. Башкатова В.Г. Влияние высоких нетоксичных доз кофеина на активность нитроергической системы мозга крыс. Наркология. 2013. Т. 12. № 8. С. 42–45.
21. Верная О.И., Шабатин В.П., Шабатина Т.И., Хватов Д.И., Семенов А.М., Юдина Т.П. и др. Криохимическая модификация диоксидина, его активность и токсичность. Журнал физической химии. 2017. Т. 91. № 2. С. 230–233. doi: 10.7868/S0044453717020339

References

1. Depression. *World Health Organization*. [cited 2020 Jan 30]. Available from: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/depression>
2. Garibova TL, Kraineva VA, Voronina TA. Animal models of depression. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2017;(3):14–19. (In Russ).
3. Peters JM. Factors affecting caffeine toxicity: a review of the literature. *The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs*. 1967;7(3):131–141.
4. Pham NM, Nanri A, Kurotani K, Kuwahara K, Kume A, Sato M, et al. Green tea and coffee consumption is inversely associated with depressive symptoms in a Japanese working population. *Public Health Nutrition*. 2014;17(3):625–633. doi: 10.1017/S1368980013000360
5. Park RJ, Moon JD. Coffee and depression in Korea: the fifth Korean National Health and nutrition examination survey. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2015;69(4):501–504. doi: 10.1038/ejcn.2014.247
6. Proskuryakova TV, Grishin ME. Caffeine and mental health. *Psihicheskoe zdorov'e*. 2016;14(10):76–82. (In Russ).
7. Lucas M, O'Reilly EJ, Pan A, Mirzaei F, Willett WS, Okereke OI, et al. Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: results from three prospective cohorts of American adults. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2014;15(5):377–386. doi: 10.3109/15622975.2013.795243
8. James JE. Are coffee's alleged health protective effects real or artifact? The enduring disjunction between relevant experimental and observational evidence. *Journal of Psychopharmacology*. 2018;32(8):850–854. doi: 10.1177/0269881118771780
9. Bashkatova VG, Nazarova GA, Alexeeva EV. Effect of prenatal administration of caffeine on behavior of rats in the elevated plus maze test. *Problems of modern science and education*. 2016; 40(82):15–17. (In Russ).
10. Markova EV, Knyazheva MA, Savkin IV, Tikhonova MA, Amstislavskaya TG. Relief of behavioral patterns of a depressive-like state in experimental animals by transplantation of immune cells modulated by a psychoactive substance. *Medical Immunology*. 2017;19(S):48–49. (In Russ).
11. Arushanyan EB, Popov AV. Peculiarities of the temporal organization of the behavioral response to caffeine in rats. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2005;68(1):10–12. (In Russ).
12. Bashkatova VG, Alexeeva EV, Bogdanova NG, Nazarova GA. Effect of acute administration of caffeine in different doses on behavior of adult rats. *Narcology*. 2017;16(12):9–13. (In Russ).
13. Kalinin AY. Caffeine: friend or foe? *Kompetentnost'*. 2014;9(43):120–121. (In Russ).
14. Szopa A, Doboszewskab U, Herbetc M, Woskoa S, Wyskad E, Swiadera K, et al. Chronic treatment with caffeine and its withdrawal modify the antidepressant-like activity of selective serotonin reuptake inhibitors in the forced swim and tail suspension tests in mice. Effects on Comt, Slc6a15 and Adora1 gene expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017;337:95–103. doi: 10.1016/j.taap.2017.10.020
15. Kurchatova MN, Durnova NA, Polukonova NV. Effects of extracts containing bioflavonoids for the induction of micronuclei dioxidine in blood erythrocytes unprotected white mouse. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2014;(2):58–65. (In Russ).
16. Durnev AD, Kulakova AV, Zhanataev AK, Oganesyants LA. Evaluation of the cytogenetic and mutagen-modifying activity of caffeine in mouse bone marrow cells. *Hygiene and Sanitation*. 2015;94(3):106–110. (In Russ).
17. Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *European Journal of Pharmacology*. 1979;57(2–3):201–210.
18. Kovaleva MA, Makarova MN, Makarov VG, Goryacheva MA. Application of «forced swimming» test for preclinical trials. *International bulletin of Veterinary Medicine*. 2015;(4):90–95. (In Russ).
19. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004;61(7–8):857–872.
20. Bashkatova VG. The influence of high non toxic dose of caffeine on the generation of nitric oxide in brain structures of rats. *Narcology*. 2013;12(8):42–45. (In Russ).
21. Vernaya OI, Shabatin VP, Shabatina TI, Khvatov DI, Semenov AM, Yudina TP, et al. Cryochemical modification, activity, and toxicity of dioxidine. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017; 91(2):230–233. (In Russ). doi: 10.7868/S0044453717020339

Ответственный за переписку: Дурнова Наталья Анатольевна – доктор биологических наук, доцент, зав. кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, 410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112, E-mail: ndurnova@mail.ru

Дурнова Н.А. SPIN: 3348–2957, ORCID ID: 0000–0003–4628–9519

Каретникова А.Ю. SPIN: 1374–9994, ORCID ID: 0000–0002–8043–3142

Исаев Д.С. SPIN: 9105–1500, ORCID ID: 0000–0003–4053–0535

Кланцатая А.Р. SPIN: 8085–0152, ORCID ID: 0000–0002–5387–1606

Шереметьева А.С. SPIN: 3755–4410, ORCID ID: 0000–0002–0022–8318

Corresponding author: Durnova Natalya Anatolievna – Doctor of Biological Sciences, Assistant Professor, Head of the Department of General Biology, Pharmacognosy and Botany, Razumovsky Saratov State Medical University; 410012, Russia, Saratov, Bolshaya Kazachya, 112. E-mail: ndurnova@mail.ru

Durnova N.A. ORCID ID: 0000–0003–4628–9519

Karetnikova A. Yu. ORCID ID: 0000–0002–8043–3142

Isaev D.S. ORCID ID: 0000–0003–4053–0535

Klantsataya A.R. ORCID ID: 0000–0002–5387–1606

Sheremeteyeva A.S. ORCID ID: 0000–0002–0022–8318

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
CLINICAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337

Церамиды как биомаркеры хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом второго типа

К.Г. Унаньян¹, И.П. Балмасова², В.Н. Царев², А.М. Мкртумян²,
К.С. Эльбекьян³, К.Г. Каракоев³, С.Д. Арутюнов²

¹ Динская Центральная районная больница, Краснодар, Российская Федерация

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

³ Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Ассоциация хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 является одним из наиболее частых проявлений системных эффектов, этиологически связанных с пародонтопатогенными бактериями в составе биопленки зубодесневой борозды. В связи с этим исследование метаболических механизмов, приводящих к таким системным эффектам и служащих их маркерами, является актуальной проблемой. *Цель.* Исследование особенностей метаболизма сфинголипидов/церамидов, как продуцируемых этиологически значимой микрофлорой, так и присутствующих в тканях пародонта пациентов на примере ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2. *Материалы и методы.* Группы наблюдения включали 58 больных хроническим пародонтитом в ассоциации с сахарным диабетом типа 2, 39 больных хроническим пародонтитом без сопутствующей системной патологии, 27 условно здоровых людей. Всем обследованным проводились молекулярно-генетические исследования таксономического и метаболического профилей микробиоты зубодесневой борозды / пародонтальных карманов с использованием 16S секвенирования и оценка в слюне фосфорилированных церамидов по активности фермента церамид киназы. *Результаты.* Было установлено, что при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 имеются особенности таксономического состава микробиоты зубодесневой борозды/пародонтальных карманов, которые сочетаются со снижением метаболизма сфинголипидов. Кроме того, у этих больных в зависимости от длительности сахарного диабета отмечено нарастающее падение в слюне церамид киназы, определяющей фосфорилирование сфинголипидов/церамидов. *Заключение.* При ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 системные эффекты микробиоты зубодесневой борозды / пародонтальных карманов проявляются снижением метаболизма сфинголипидов, обусловленных в том числе снижением церамид киназы в тканях пародонта, что может служить маркером сочетанного патологического процесса.

Ключевые слова: хронический пародонтит, сахарный диабет типа 2, микробиота, сфинголипиды, церамиды, церамид киназа

© Унаньян К.Г., Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М., Эльбекьян К.С., Каракоев К.Г., Арутюнов С.Д., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Вклад авторов: Унаньян К.Г. – сбор и статистическая обработка клинического материала, оформление и интерпретация результатов; Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М. – анализ данных литературы по проблеме, обсуждение результатов исследования; Эльбекьян К.С., Караков К.Г. – организация и выполнение лабораторных исследований, их оценка; Арутюнов С.Д. – планирование исследований, оформление и интерпретация результатов.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют, что исследование проводилось в отсутствие каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов

Благодарности. Авторы выражают большую благодарность сотрудникам Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России (Москва) за выполнение метагеномного анализа.

Поступила 20.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Унаньян К.Г., Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М., Эльбекьян К.С., Караков К.Г., Арутюнов С.Д. Церамиды как биомаркеры хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом второго типа // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 325–337. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337

Ceramids as biomarkers of chronic periodontitis associated with type 2 diabetes

K.G. Unanyan¹, I.P. Balmasova², V.N. Tsarev², A.M. Mkrtyumyan²,
K.S. Elbekyan³, K.G. Karakov³, S.D. Arutyunov²

¹ Dinskaya Central District Hospital, Krasnodar, Russian Federation

² A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
Moscow, Russian Federation

³ Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Annotation. Relevance. The association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus is one of the most frequent manifestations of systemic effects that are etiologically associated with periodontopathogenic bacteria in the biofilm of the gingival sulcus. In this regard, the study of the metabolic mechanisms leading to such systemic effects and serving their markers is an urgent problem. **Aim.** Study of the features of sphingolipid/ceramide metabolism, both produced by etiologically significant microflora, and present in periodontal tissues of patients on the example of the association of chronic periodontitis with type 2 diabetes. **Materials and methods.** The observation groups included 58 patients with chronic periodontitis in association with type 2 diabetes, 39 patients with chronic periodontitis without concomitant systemic pathology, and 27 conditionally healthy people. All the examined patients underwent molecular genetic studies of the taxonomic and metabolic profiles of the dental sulcus/periodontal pockets microbiota using 16S sequencing and evaluation of phosphorylated ceramides in saliva by the activity of the ceramid kinase enzyme. **Results.** It was found that in the Association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus, there are features of the taxonomic composition of the dental sulcus/periodontal pockets microbiota, which are combined with a decrease in sphingolipid metabolism. In addition, in these patients, depending on the duration of diabetes mellitus, there was an increasing drop in the saliva of ceramide kinase, which determines the phosphorylation of sphingolipids/ceramides. **Conclusion.** In the Association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus, the systemic effects of the dental sulcus/periodontal pockets microbiota are manifested by a decrease in sphingolipid metabolism, including a decrease in ceramid kinase in periodontal tissues, which can serve as a marker of the combined pathological process.

Key words: chronic periodontitis, type 2 diabetes mellitus, microbiota, sphingolipids, ceramides, ceramid kinase

Author contributions: Unanyan K.G. – collection and statistical processing of clinical material, design and interpretation of results; Balmasova I.P., Tsarev V.N., Mkrtumyan A.M. – analysis of literature data on the problem, discussion of research results; Elbekyan K.S., Karakov K.G. – organization and execution of laboratory studies, their evaluation; Arutyunov S.D. – research planning, design and interpretation of results.

Conflict of interest statement. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments. The authors express great gratitude to the staff of the Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine of Federal Medical and Biological Agency of Russia (Moscow) for metagenomic analysis performing.

Received 20.08.2020. 2020. Accepted 11.09.2020.

For citation: Unanyan K.G., Balmasova I.P., Tsarev V.N., Mkrtumyan A.M., Elbekyan K.S., Karakov K.G., Arutyunov S.D. Ceramids as biomarkers of chronic periodontitis associated with type 2 diabetes mellitus. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):325–337. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337

Введение

Заболевания пародонта – это, в основном, хронические инфекционные заболевания, возникающие в результате реакции на микробиом зубного налета, содержащий различные виды пародонтопатогенных бактерий. Эти заболевания имеют сложный этиопатогенез и возникают в результате сочетания целого ряда факторов, приводящих к разрушению пародонта, необратимой резорбции костной ткани и потере зубов [1]. Заболевания пародонта – одни из наиболее часто встречающихся патологических состояний: в процентном отношении распространенность заболеваний пародонта в мировом масштабе составляет в среднем 94,3 % [2].

Помимо того, что заболевания пародонта оказывают большое влияние на здоровье населения в силу их распространенности, они связаны с рядом системных заболеваний [3], включая сахарный диабет [4], сердечно-сосудистые заболевания, в том числе атеросклероз [5], ревматоидный артрит [6], исходы беременности [7] и многие другие.

Большинство авторов признает, что ведущее значение в этиологии поражения околозубных тканей выполняют грамотрицательные анаэробные бактерии, к числу которых, в частности, причисляют *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas*

endodontalis и другие [8]. Каждый из указанных микроорганизмов обладает уникальным набором факторов вирулентности, сочетание которых обеспечивает синергизм пародонтопатогенного эффекта формирующихся микробных ассоциаций [9].

Гораздо менее изученной проблемой является роль пародонтопатогенной микрофлоры и сопутствующих им бактерий в развитии системных эффектов, в частности, при сочетании заболеваний пародонта с сахарным диабетом 2-го типа.

Сахарный диабет относится к категории широко распространенных метаболических патологических процессов. Это довольно сложное и неоднозначное по этиопатогенезу заболевание возникает либо в связи с неспособностью β -клеток поджелудочной железы вырабатывать инсулин либо из-за развития устойчивости клеток периферических тканей к инсулину. Диабет типа 2 (инсулинонезависимый), составляющий 90 % среди всех больных сахарным диабетом, характеризуется относительной гиперинсулинемией и вызван устойчивостью клеток к инсулину [10].

По мнению современных исследователей, в основе патогенеза сахарного диабета лежат четыре ведущих механизма – гипергликемия, резистентность клеток к инсулину, гиперлипидемия, иммунные дисфункции [11]. Указанные механизмы, проявляющиеся на местном уровне, лежат в основе патогенеза и хронического пародонтита, в соответствии

с чем в последние годы появилось довольно много свидетельств того, что не только сахарный диабет влияет на развитие пародонтита, но и заболевания пародонта могут оказывать воздействие на развитие и течение сахарного диабета [12], в том числе через пародонтопатогенную микрофлору.

В этом контексте особое значение придается липидным компонентам пародонтопатогенов, в частности, сфинголипидам. Сфинголипиды – это класс липидов, относящихся к производным алифатических аминокислот. Наиболее простыми сфинголипидами являются церамиды, которые содержат в своем составе сфингозин и жирную кислоту [13].

К настоящему времени известно, что фосфорилированные дигидроцерамиды пародонтопатогенов, в частности, *P. gingivalis*, способствуют провоспалительным реакциям и морфологическим изменениям фибробластов [14] и содержатся в образцах десневой ткани с клиническими проявлениями пародонтита. Фосфорилированные дигидроцерамиды *P. gingivalis* способны к взаимодействию с Toll-подобный рецептором 2 (TLR2) и стимулируют секрецию дендритными клетками интерлейкина-6 [15], ингибируют функции остеобластов и отложение минералов в костной ткани *in vivo* и *in vitro* [16]. Показано также, что отсутствие синтеза сфинголипидов у *P. gingivalis* снижает экспрессию таких факторов вирулентности этих бактерий, как гингипаины и капсула [17]. Сфинголипиды участвуют в процессах внутриклеточной инвазии пародонтопатогенов, способствуют их выживанию внутри клеток человека и дальнейшему распространению по организму, обеспечивая системные эффекты [18]. При этом фосфорилированные дигидроцерамиды бактерий, образующиеся под влиянием церамид киназы, могут восстанавливаться, попадая в ткани человека [19].

В тканях человека сфинголипиды/церамиды могут реализовать многие системные эффекты. В частности, отмечено участие церамидов в апоптозе β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы и их роль в формировании резистентности к инсулину и патогенезе сахарного диабета 2-го типа [20]. Воздействуя на макрофаги, фосфорилированные с участием церамид киназы церамиды оказывают антиапоптотический эффект и подавляют воспалительные реакции [21].

Таким образом, сфинголипиды/церамиды пародонтопатогенов играют огромную роль в становлении вирулентности этих бактерий и в принципе могут способствовать проявлению не только местных (в пародонтальных тканях), но и системных эффектов, хотя детали такой взаимосвязи пока не ясны. В связи с этим целью данной работы служило исследование особенностей метаболизма сфинголипидов/церамидов, как продуцируемых этиологически значимой микрофлорой, так и присутствующих в тканях пародонта пациентов на примере ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2.

Материалы и методы

Клинический материал включал 124 человека, которые составили 3 группы исследования – основную группу, группу сравнения и контрольную группу. В основную группу входили 58 пациентов с ассоциацией хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2; группа сравнения состояла из 39 больных хроническим пародонтитом без сопутствующей соматической патологии; контрольная группа содержала 27 человек без признаков хронического пародонтита с санированной ротовой полостью. Во всех группах преобладали женщины, все обследованные пациенты были в возрасте от 45 до 70 лет.

У всех обследованных людей было получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). При этом проводились молекулярно-генетические исследования микробиоты зубодесневой борозды/ пародонтальных карманов и оценка в слюне фосфорилированных церамидов по активности фермента церамид киназы.

Количественную оценку содержания в биоматериале из пародонтальных карманов/зубодесневой борозды бактерий, принадлежащих к родам *Porphyromonas* и *Sphingobacteria*, проводили с использованием набора «Дентоскрин» производства ООО НПФ Литех согласно протоколу производителя.

Для выполнения метагеномного анализа тотальную бактериальную ДНК из образцов выделяли с использованием QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Образцы ДНК для 16S секвенирования методом дробовика готовились путем пулирования геномной ДНК образцов внутри каждой группы исследования, взятых в эквимольных количествах. Для обогащения геномной ДНК микробов каждого пула использовались комплекты для обогащения ДНК микробиома Nebnext в соответствии с инструкциями производителя. Для проведения таксономического анализа результатов секвенирования переменных участков гена 16S рРНК была применена биоинформационная платформа микробиома QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology) [22] и база данных SILVA [23]. Для выявления статистических различий между группами на уровне метаболических путей применяли статистический анализ метаболических профилей STAMP [24] и балансы дендрограммы (CoDa dendrogram) [25].

Количественное определение церамид киназы в слюне проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием микропланшетного ридера «Дупех MRX II» (Dyplex technologies, USA) в соответствии с инструкцией по применению прибора и тест-систем.

Результаты и обсуждение

При анализе данных секвенирования 16S гена малой субъединицы рибосомальной РНК было обнаружено 60 бактериальных родов в пулированных образцах всех трех групп исследования. Пулированные (смешанные) образцы использовались с учетом группы, к которой принадлежали обследованные, чтобы обеспечить необходимое для метагеномного анализа (методом дробовика) количество бактериальной ДНК в изучаемой пробе.

Для выяснения роли пародонтопатогенной микрофлоры в составе микробиоты пародонтальных карманов при хроническом пародонтите и зубодесневой борозды у здоровых людей, прежде всего, определялось распределением этих родов бактерий в группах исследования. Для этой цели использовался поэтапный биоинформационный анализ, как это показано на рисунке 1. Для построения модели таксономических различий между группами исследования использовались так называемые балансы дендрограммы (CoDa dendrogram). Эта модель описывает интенсивность таксономических изменений при перемещении профилей метагеномов от здорового состояния к хроническому пародонтиту и далее к хроническому пародонтиту, ассоциированному с сахарным диабетом типа 2.

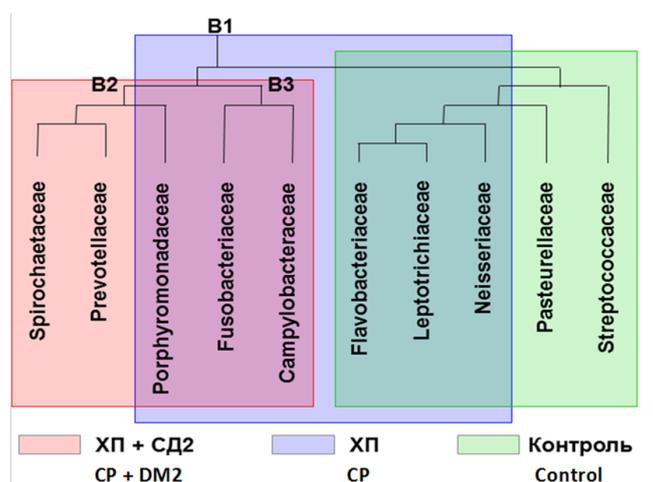


Рис. 1. Балансы дендрограммы преимущественного таксономического состава микробиоты в группах исследования
Fig. 1. CoDa dendrograms of the predominant taxonomic composition of the microbiota in the study groups

Как следует из дендрограммы, из всего многообразия семейств бактерий, обитающих в полости рта и входящих в состав биопленки пародонтальных карманов / зубодесневой борозды, наибольшее представительство приходится на 10 семейств, которые регистрировались во всех случаях, но с разной частотой встречаемости в группах. Баланс В1 позволяет довольно четко разграничивать состав микробиомов группы здоровых людей и больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2.

Так, группа хронического пародонтита в ассоциации сахарного диабета типа 2 связана с относительным ростом представительства 5 бактериальных семейств: *Campylobacteraceae*, *Fusobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* и *Spirochaetaceae*, а относительное содержание бактерий семейств *Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae*, *Neisseriaceae*, *Flavobacteriaceae* и *Leptotrichiaceae* уменьшалось. В то же время здоровое состояние (контрольная группа) характеризовалось прямо противоположным образом.

Интересно, что группа хронического пародонтита без сопутствующей системной патологии занимала пограничное положение между двумя другими группами. Кроме того, балансы В2 и В3 показывают, что семейства бактерий *Prevotellaceae* (в него входит *Prevotella intermedia*) и *Spirochaetaceae* (входит *Treponema denticola*) больше связаны с группой хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, чем с группой только хронического пародонтита, а семейства *Porphyromonadaceae* (включает пародонтопатогены *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*), *Fusobacteriaceae* (*Fusobacterium nucleatum*), *Campylobacteraceae* с большей частотой отмечены при хроническом пародонтите без сопутствующей патологии.

Как показывает рисунок 2, таксономические различия в метагеномах разных групп исследования были ассоциированы с различиями в функциональном (метаболическом) потенциале микробных сообществ.

Оценка результатов, полученных в результате определения состояния метаболических реакций в пародонте с участием микробиома, проводилась в сравнительном аспекте: путем сопоставления групп «хронический пародонтит – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – хронический пародонтит».

При сравнении групп «хронический пародонтит – контроль» основные различия касались обмена аминокислот и энергетического обмена. В группе хронического пародонтита был снижен уровень обмена таких аминокислот, как цистеин, метионин (ko00270), гистидин (ko00340), а также наблюдалось относительное снижение роли метаболических путей серы (ko00920) и глицеролипидов (ko00561).

Группа хронического пародонтита в сочетании с сахарным диабетом типа 2 и контрольная группа различаются по гораздо большему числу метаболических признаков, причем совершенно иных, чем выявленных при предыдущем сопоставлении. Единственный признак, который отличает от контроля наличие хронического пародонтита вне зависимости от сопутствующей патологии – это снижение метаболизма глицеролипидов. Этот результат показывает, что метаболизм микробиома при хроническом пародонтите, ассоциированном с сахарным диабетом типа 2, принципиально отличается от метаболизма микробиома в отсутствие сопутствующей патологии.

Наиболее отчетливо эти особенности регистрируются при сравнении двух групп хронического пародонтита между собой. Были выявлены 5 метаболических путей, по которым отмечалось подобное различие. Группа «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2» характеризовалась повышенным метаболизмом цистеина и метионина (ko00270) и снижением метаболизма пиримидина (ko00240), метаболизма метана (ko00680), биосинтеза жирных кислот (ko00061) и метаболизма сфинголипидов (ko00600). Такой признак, как снижение метаболизма, присущего стафилококковой инфекции, в данном случае не рассматривается нами как не связанный с этиологией хронического пародонтита.

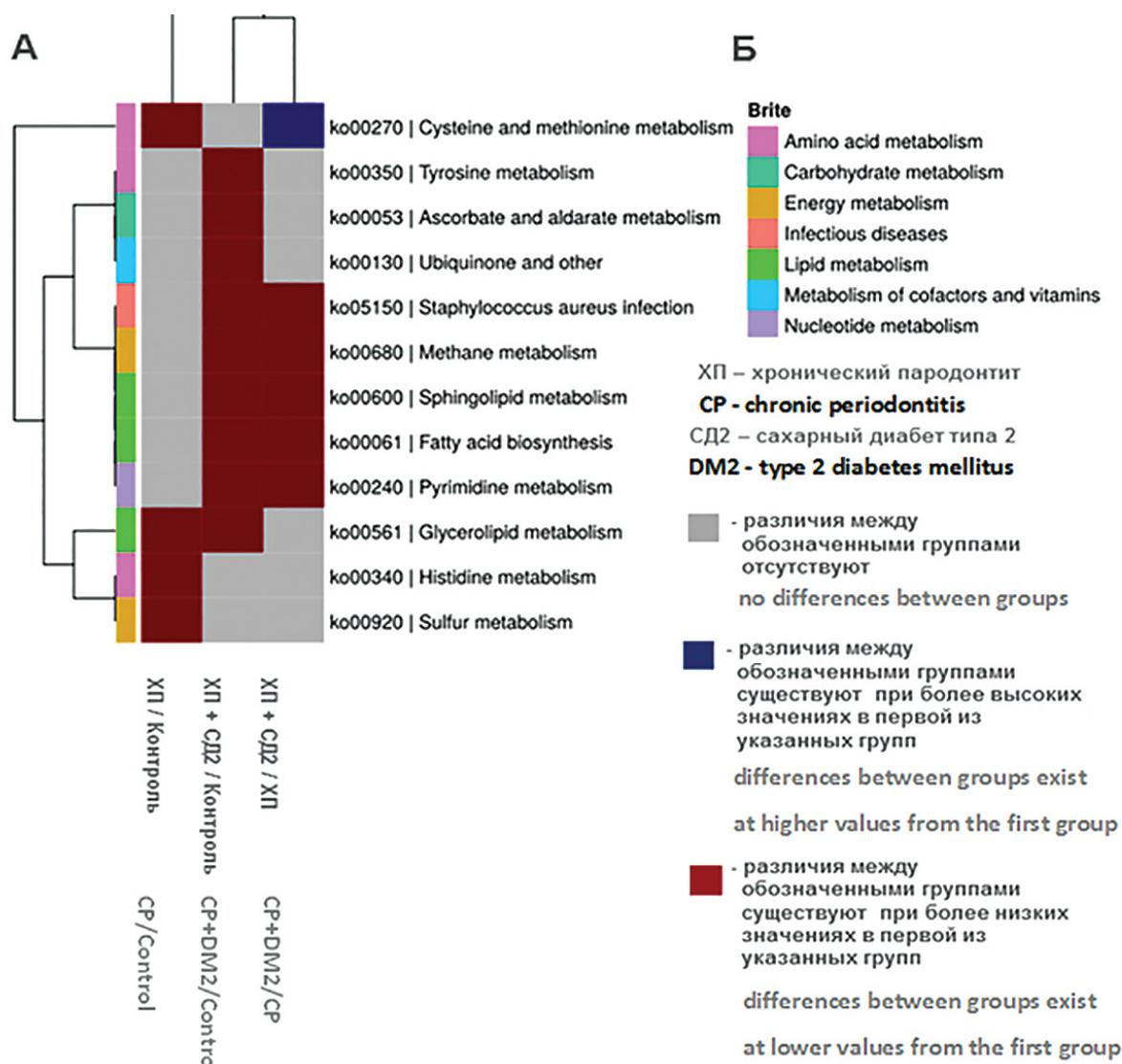


Рис. 2. А – график межгрупповых различий в функциональном профиле микробиома пародонтальных карманов/зубодесневой борозды; Б – природа метаболических реакций

Fig. 2. A – graph of group differences in the functional profile of the microbiome periodontal pockets/gingival sulcus; B – nature of metabolic reactions

Таким образом, есть четыре метаболических пути, сокращение которых характерно для группы хронического пародонтита в сочетании с сахарным диабетом типа 2 и отличает эту группу от контрольной группы и группы хронического пародонтита: метаболизм пириимидина (ko00240), метаболизм метана (ko00680), метаболизм сфинголипидов (ko00600) и биосинтез жирных кислот (ko00061).

Иными словами, среди указанных особенностей довольно значительную часть составляет липидный метаболизм.

Исходя из контекста данной работы, снижение метаболизма сфинголипидов как особенность микробиома у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, представляется очень важной. Источники научной

литературы показывают, что в составе микробиома полости рта наиболее активными продуцентами сфинголипидов, в том числе фосфорилированных керамидов, среди пародонтопатогенов являются представители семейства Porphyromonadaceae [26]. Кроме того, сфинголипиды в большом количестве продуцируют сапрофитические микроорганизмы, обитающие в полости рта и принадлежащие к семейству Sphingobacteriaceae [27].

Методом ПЦР определялось суммарное содержание в биологическом материале из пародонтальных карманов/зубодесневой борозды во всех трех группах исследования представителей названных семейств. 95 % доверительные интервалы грам-эквивалентов ДНК бактерий родов в Porphyromonas и Sphingobacteria, а также диагностическая значимость различий в содержании этих бактерий в исследуемых группах путем построения ROC-кривых и определения площади под ними (AUC) представлены на рисунке 3.

Рисунки показывают, что представители рода Porphyromonas исключительно редко обнаруживаются в контрольной группе здоровых людей и с довольно высокой частотой при хроническом пародонтите, независимо от ассоциации с сахарным диабетом типа 2, хотя тенденция к более высоким значениям присуща этим бактериям в группе хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2. Построение ROC-кривых, отражающих соотношение чувствительности и специфичности диагностической пробы, показало максимальные значения площади под ROC-кривой (AUC), равные 1,0, для различий группы хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, с контролем, но, в отличие от столь высокой значимости разницы между указанными группами, AUC для двух групп хронического пародонтита была равна 0,615, то есть показывала лишь умеренную диагностическую значимость.

Совершенно иные соотношения установлены по содержанию в пародонтальных карманах/зубодесневой борозде сапрофитических бактерий рода Sphingobacteria, тоже способных к продукции сфинголипидов. Наиболее высокое содержание этих бактерий выявлено в группе контроля. Меньшие

значения были присущи группе хронического пародонтита, а наиболее низкое содержание, близкое к нулю, определено при хроническом пародонтите, ассоциированном с сахарным диабетом типа 2. Диагностическая значимость этих результатов была очень высокой и в единицах AUC выражалась в значениях, близких к единице (0,917; 0,925).

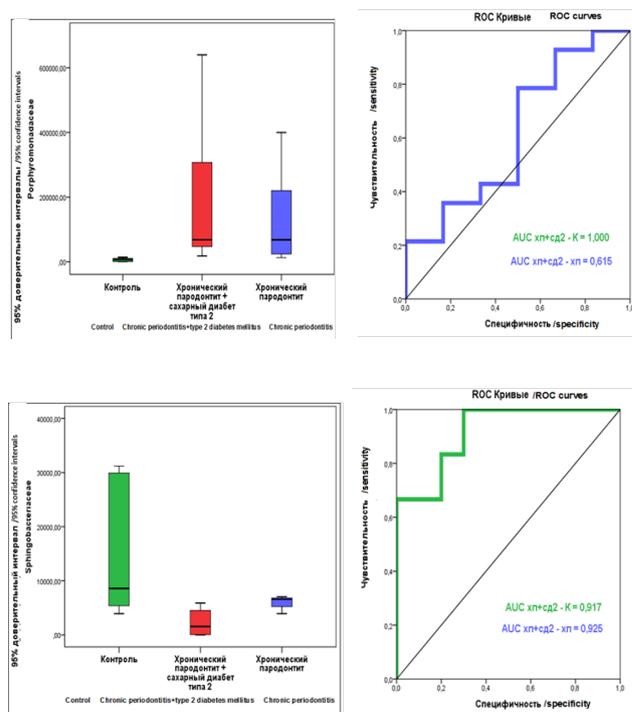


Рис. 3. 95 % доверительные интервалы содержания в микробиоме пародонтальных карманов/зубодесневой борозды основных продуцентов керамидов в группах исследования

Fig. 3. 95 % confidence intervals in the microbiome of periodontal pockets/gingival sulcus of the main ceramide producers in the study groups

С учетом того, что одним из важнейших показателей обмена фосфорилированных керамидов в тканях ротовой полости может служить содержание керамид киназы в слюне обследуемых людей, было проведено подобное тестирование в слюне больных хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, а также здоровых лиц. Результаты такого исследования представлены в таблице 1 и на рисунке 4.

Таблица 1
Содержание церамид киназы в слюне в группах исследования

Table 1
The content of ceramide kinase in saliva in the study groups

Группы исследования/ Research Groups	Церамидаза слюны (нг/мл)/ Salivary ceramidase (ng/ml)	p по критерию Манна-Уитни/ p by criterion Mann-Whitney
Группа хронического пародонтита в ассоциации с сахарным диабетом типа 2/ Chronic periodontitis group in association with type 2 diabetes mellitus	16,9 ± 14,2	$p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$
Хронический пародонтит/ Chronic periodontitis	44,0 ± 18,7	$p_1 = 0,004^*$
Контрольная группа/ Control group	71,3 ± 15,0	-

Примечание: p_1 – вероятность различий между показателями в группах больных хроническим пародонтитом и контролем, p_2 – вероятность различий между показателями в группах больных хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, * – достоверность различий

Note: p_1 – the probability of differences between the indicators in the groups of patients with chronic periodontitis and control, p_2 – the probability of differences between the indicators in the groups of patients with chronic periodontitis, associated and not associated with type 2 diabetes mellitus, * – significance of differences

Как следует из таблицы и рисунка, содержание церамид киназы в слюне больных хроническим пародонтитом достоверно падает – на 38 %. При этом в тех случаях, когда хронический пародонтит сочетается с сахарным диабетом типа 2, падение уровня церамид киназы становится еще более значительным и достигает 76 %.

Описания этого феномена мы не обнаружили в доступной литературе, в то время как показатель уровня церамид киназы в слюне может служить маркером хронического пародонтита. Мы предположили также, что степень падения уровня церамид киназы в слюне при сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 может иметь прогностическое значение (95 % доверительный интервал ниже 25 нг/мл).

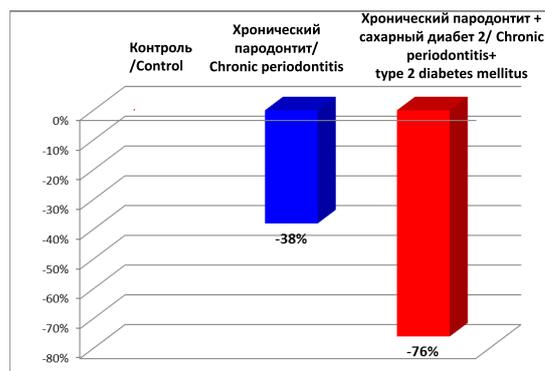


Рис. 4. Проценты отклонения от контроля содержания церамид киназы в слюне больных по группам исследования

Fig. 4. Percentage deviation from control of ceramide kinase content in saliva of study groups patients

Для проверки высказанного предположения была сделана попытка установить взаимосвязь между продолжительностью сахарного диабета и степенью падения церамид киназы в слюне, как это показано на рисунке 5.

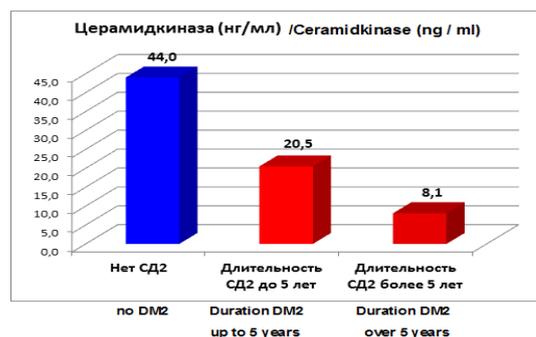


Рис. 5. Степень снижения среднего уровня церамид киназы в слюне больных хроническим пародонтитом в зависимости от наличия и длительности сахарного диабета типа 2 (СД2)

Fig. 5. The degree of decrease in the average level of ceramide kinase in the saliva of patients with chronic periodontitis, depending on the presence and duration of type 2 diabetes (CD2)

Как следует из рисунка, падение уровня церамид киназы, связанное с развитием сопутствующего сахарного диабета типа 2, зависело от длительности последнего. Так, при продолжительности заболевания более 5 лет степень падения содержания церамид киназы в слюне возрастала по средним ве-

личинам в 2,5 раза. Более того, попытка определить корреляцию между таким общепринятым критерием развития сахарного диабета, как рост содержания глюкозы в крови и уровнем церамид киназы в слюне, показал достоверную корреляционную связь между этими параметрами ($r = -0,508^*$), в то время как в отсутствие сахарного диабета у больных хроническим пародонтитом значимой корреляционной связи установить не удалось ($r = 0,031$, где r – коэффициент корреляции).

Таким образом, у больных хроническим пародонтитом падение уровня церамид киназы в слюне ниже 25 нг/мл может свидетельствовать об угрозе развития системных эффектов в виде сопутствующего сахарного диабета 2-го типа.

Результаты исследования, на наш взгляд, требуют обсуждения в нескольких аспектах – (1) существуют ли особенности микробиома пародонта таксономического или метаболического характера при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2; (2) может ли хронический пародонтит в той или иной степени влиять на течение сахарного диабета? (2) играют ли сфинголипиды/церамиды пародонтопатогенов патогенетически значимую роль при наличии такого влияния? (3) существуют ли маркеры подобного влияния?

Проведенные исследования на метагеномном уровне с использованием биоинформационных технологий несомненно доказывают, что как таксономический состав микробиоты пародонтальных карманов, так и метаболизм входящих в ее состав бактерий обладают выраженными особенностями у пациентов с ассоциацией хронического пародонтита. В контексте поставленных задач обращает на себя внимание зарегистрированное нами отчетливое преобладание в составе микробиома пародонта при сочетанной патологии пародонтопатогенных бактерий семейств Porphyromonadaceae и Prevotellaceae с установленной в результате многочисленных исследований способностью к активной продукции сфинголипидов и принадлежащих к ним церамидов, которые могут не только оказывать широкий спектр воздействий на ткани пародонта [14, 15, 16, 17], но и принимать участие в патогенезе сахарного диабета второго типа, а также проявлять другие системные эффекты [18,

20, 21]. Эти факты свидетельствуют в пользу той точки зрения, что хронический пародонтит через свою микрорфлору может оказывать влияние на течение сахарного диабета.

Подобное влияние не является односторонним. Полученные нами в результате биоинформационного анализа данные косвенно свидетельствуют о том, что состав микробиома пародонта при его хроническом воспалении является промежуточным статусом между здоровым состоянием и хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2. Иными словами, ассоциация хронического пародонтита на фоне сахарного диабета типа 2 может расцениваться не столько как первичное, сколько как вторичное состояние, то есть микробиом пародонта в значительной степени связан с сопутствующим сахарным диабетом и реагирует на него изменением своего таксономического состава.

В то же время оценка полученных результатов на метаболическом уровне выявила и довольно противоречивые данные. Метагеномным анализом было установлено, что в группе хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, отмечалось падение биосинтеза сфинголипидов в составе микробиома пародонтальных тканей. С одной стороны, этому теоретически могло бы способствовать низкое содержание в микробиоме этих больных сапрофитических бактерий рода *Sphingobacteria*, характеризующихся выраженной способностью к синтезу сфинголипидов [27], однако, наряду с этим, в биопленке больных данной группы отмечено, как было показано выше, довольно высокое содержание других сфинголипид-продуцирующих бактерий, относящихся к пародонтопатогенам. Таким образом, при ассоциации сахарного диабета и хронического пародонтита было зарегистрировано определенное противоречие – рост содержания в составе микробиома пародонта бактерий, активно продуцирующих сфинголипиды и их разновидность – церамиды, а с другой стороны, несомненное падение способности микробиома к метаболизму сфинголипидов.

Чтобы разрешить это противоречие, не установленное при хроническом пародонтите без сопутствующей патологии, была сделана попытка уста-

новить возможный механизм развития указанного феномена. Она основана на том, что большинство биологических эффектов керамидов связано с их фосфорилированной фракцией [26], формирование которой происходит при участии фермента керамидкиназы [19], содержание которой в ротовой полости (в слюне) определялось в процессе исследований.

Было отмечено падение уровня керамидкиназы в слюне, которое клинически можно связать с ростом провоспалительных эффектов в тканях, сопутствующих сахарному диабету, а патогенетически – с ростом проапоптотического действия фосфорилированных керамидов [20, 21], продуцируемых пародонтопатогенами, на пораженные ими клетки при сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2, усугубляющих течение хронического пародонтита.

В этой ситуации зарегистрированное нами в ходе метагеномного анализа снижение биосинтеза сфинголипидов при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 на фоне столь резкого падения активности тканевой керамидкиназы и роста присутствия ключевого пародонтопатогена *P. gingivalis* можно интерпретировать следующим образом.

P. gingivalis реализует свою вирулентность и воспалительно-повреждающее действие на ткани, в первую очередь, с участием фосфорилированных керамидов. Снижение эффективности этого процесса при сопутствующем сахарном диабете типа 2 с его способностью создавать условия для прогрессирующего развития хронического пародонтита противоречит создавшейся ситуации и может означать только одно – происходит «экранирование» данного пародонтопатогена от защитных и метаболических реакций пародонтальных тканей с соответствующими фенотипическими изменениями бактериальных клеток. Такое экранирование и сопутствующие ему изменения фенотипа возможны, например, при переходе этого пародонтопатогена к внутриклеточному паразитированию, что обеспечило бы ему рост выживаемости внутри клеток и возможность распространяться по организму, например, в составе макрофагов, с осуществлением системных эффектов.

Выводы

1. Микробиом пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, отличается по своим таксономическим признакам (более высокое содержание представителей семейств (Prevotellaceae и Spirochaetaceae) от такового у пациентов с хроническим пародонтитом без сопутствующей системной патологии.

2. Микробиом пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, отличается по набору характерных метаболических признаков от такового у пациентов с хроническим пародонтитом без сопутствующей системной патологии.

3. В набор характерных метаболических признаков микробиома пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, входит падение метаболизма сфинголипидов.

4. В слюне больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, достоверно снижено содержание керамидкиназы, участвующей в метаболизме наиболее активной фаракции сфинголипидов – фосфорилированных керамидов.

5. Степень падения в слюне уровня керамидкиназы связано с длительностью сахарного диабета и уровнем глюкозы в крови и при значениях <25 нг/мл может служить маркером сочетанной патологии – хронического пародонтита и сахарного диабета второго типа.

Библиографический список

1. Hajshengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012. Vol. 10 (10). P. 717–725.
2. Лепеева Н.А., Ермолаева Л.А., Шишкин А.Н. Состояние тканей пародонта у больных метаболическим синдромом. *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2012. Т. 11 (3). С. 145–152.
3. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *J Biomed Sci*. 2019. Vol. 42 (1). P. 27–35.
4. Moodley A., Wood N.H., Shangase S.L. The relationship between periodontitis and diabetes: a brief review. *SADJ*. 2013. Vol. 68 (6). P. 260–264.

5. Genco R.J., Van Dyke T.E. Prevention: reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol*. 2010. Vol. 7 (9). P. 479–480.
6. Kim J.-H., Choi I.A., Lee J.Y. et al. Periodontal pathogens and the association between periodontitis and rheumatoid arthritis in Korean adults. *J Periodontal Implant Sci*. 2018. Vol. 48 (6). P. 347–359.
7. Han Y.W. Oral health and adverse pregnancy outcomes – what’s next? *J Dent Res*. 2011. Vol. 90 (3). P. 289–293.
8. Николаева Е.Н., Царев В.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – индикаторы риска возникновения и развития пародонтита (часть 2). *Стоматология для всех*. 2011. № 4. С. 4–7.
9. Wolcott R., Costeryon J.W., Raoult D., Cutler S.J. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect*. 2013. Vol. 19 (2). P. 107–112.
10. Ng M.L., Wadham C., Sukocheva O.A. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies. *Int J Mol Med*. 2017. Vol. 39 (2). P. 243–252.
11. Verhulst M.J.L., Loos B.G., Gerdes V.E.A., Teeuw W.J. Evaluating all potential oral complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019. Vol. 10. P. 56–104.
12. Stanko P., Holla L.I. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014. Vol. 158 (1). P. 35–38.
13. Bartke N., Hannun Y.A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *J Lipid Res*. 2009. Vol. 50. P. 91–96.
14. Nichols F.C., Riep B., Mun J. et al. Structures and biological activity of phosphorylated dihydroceramides of *Porphyromonas gingivalis*. *J Lipid Res*. 2004. Vol. 45 (12). P. 2317–2330.
15. Nichols F.C., Housley W.J., O’Conor C.A. et al. Unique lipids from a common human bacterium represent a new class of Toll-like receptor 2 ligands capable of enhancing autoimmunity. *Am J Pathol*. 2009. Vol. 175 (6). P. 2430–2438.
16. Olsen I., Nichols F.C. Are sphingolipids and serine dipeptide lipids underestimated virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*? *Infect Immun*. 2018. Vol. 86 (7). e00035–18.
17. Moye Z.D., Valiuskyte K., Dewhirst F.E. et al. Synthesis of sphingolipids impacts survival of *Porphyromonas gingivalis* and the presentation of surface polysaccharides. *Front Microbiol*. 2016. Vol. 7. P. 1919–1931.
18. Li L., Michel R., Cohen J. et al. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*. 2008. Vol. 8. P. 26–36.
19. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B. et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One*. 2011. Vol. 6 (2). – e16771.
20. Кузьменко Д.И., Климентьева Т.К. Церамид: роль в апоптозе и патогенезе резистентности к инсулину. *Биохимия*. 2016. Т. 81 (9). С. 913–927.
21. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Мальшев И.Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. *Патогенез*. 2008. Т. 6 (4). С. 31–39.
22. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016. Vol. 13 (7). P. 581–583.
23. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013. Vol. 41. P. 590–596.
24. Parks D.H., Tyson G.W., Hugtholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30 (21). P. 3123–3124.
25. Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J.J. Exploring compositional data with the CoDa-dendrogram. *Austrian J Statistics*. 2011. Vol. 40 (1–2). P. 103–113.
26. Nichols F.C. Novel ceramides recovered from *Porphyromonas gingivalis*: Relationship to adult periodontitis. *J Lipid Res*. 1998. Vol. 39 (12). P. 2360–2372.
27. Lazarevic V., Whiteson K., Hernandez D. et al. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010. Vol. 11. P. 523–533.

References

1. Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(10):717–725.
2. Lepeeva N.A., Yermolayeva L.A., Shishkin A.N. Condition of periodontal tissues in patients with metabolic syndrome. *St. Petersburg University Vestnik*. 2012;11(3):145–152. (in Russ.).
3. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Journal of Biomedical Science*. 2019;42(1):27–35.
4. Moodley A., Wood N.H., Shangase S.L. The relationship between periodontitis and diabetes: a brief review. *Journal of the South African Dental Association*. 2013;68(6):260–264.
5. Genco R.J., Van Dyke T.E. Prevention: reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nature Reviews Cardiology*. 2010; 7(9):479–480.
6. Kim J.-H., Choi I.A., Lee J.Y. et al. Periodontal pathogens and the association between periodontitis and rheumatoid arthritis in Korean adults. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2018;48(6):347–359.
7. Han Y.W. Oral health and adverse pregnancy outcomes – what’s next? *Journal of Dental Research*. 2011; 90(3):289–293.
8. Nikolaeva E.N., Tsarev V.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria – indicators of the risk of periodontitis (part 2). *Stomatology for everyone*. 2011;4:4–7. (in Russ.).
9. Wolcott R., Costeryon J.W., Raoult D., Cutler S.J. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(2):107–112.
10. Ng M.L., Wadham C., Sukocheva O.A. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;39(2):243–252.
11. Verhulst M.J.L., Loos B.G., Gerdes V.E.A., Teeuw W.J. Evaluating all potential oral complications of diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2019;10:56–104.
12. Stanko P., Holla L.I. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the Palacky University, Olomouc, Czech Repub*. 2014;158 (1):35–38.
13. Bartke N., Hannun Y.A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *Journal of Lipid Research*. 2009;50:91–96.
14. Nichols F.C., Riep B., Mun J. et al. Structures and biological

- activity of phosphorylated dihydroceramides of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Lipid Research*. 2004;45(12):2317–2330.
15. Nichols F.C., Housley W.J., O’Conor C.A. et al. Unique lipids from a common human bacterium represent a new class of Toll-like receptor 2 ligands capable of enhancing autoimmunity. *The American Journal of Pathology*. 2009;175(6):2430–2438.
 16. Olsen I., Nichols F.C. Are sphingolipids and serine dipeptide lipids underestimated virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*? *Infection and Immunity*. 2018;86(7): e00035–18.
 17. Moye Z.D., Valiuskyte K., Dewhirst F.E. et al. Synthesis of sphingolipids impacts survival of *Porphyromonas gingivalis* and the presentation of surface polysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1919–1931.
 18. Li L., Michel R., Cohen J. et al. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*. 2008; 8:26–36.
 19. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B. et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One*. 2011;6(2): e16771.
 20. Kuzmenko D.I., Klimentyeva T.K. Ceramid: role in apoptosis and pathogenesis of insulin resistance. *Biochemistry*. 2016;81(9):913–927. (in Russ.).
 21. Monastyrskaya E.A., Lamina S.V., Malyshev I.I. M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in immune response and pathology. *Pathogenesis*. 2008; 6(4):31–39. (in Russ.).
 22. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 2016;13(7):581–583.
 23. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:590–596.
 24. Parks D.H., Tyson G.W., Hugtholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014;30 (21):3123–3124.
 25. Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J.J. Exploring compositional data with the CoDa-dendrogram. *Austrian Journal of Statistics*. 2011; 40(1–2):103–113.
 26. Nichols F.C. Novel ceramides recovered from *Porphyromonas gingivalis*: Relationship to adult periodontitis. *Journal of Lipid Research*. 1998;39 (12):2360–2372.
 27. Lazarevic V., Whiteson K., Hernandez D. et al. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010;11:523–533.

Ответственный за переписку: Балмасова Ирина Петровна – д.м.н., профессор, зав. лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний НИМСИ ФГБОУ ВО Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, 105275, Россия, Москва, 8-я ул. Соколиной Горы, д. 15. E-mail: iri.balm@mail.ru

Унаньян К.Г.	SPIN: 6996–2071; ORCID: 0000–0002–9109–8431
Балмасова И.П.	SPIN: 8025–8611; ORCID: 0000–0001–8194–2419
Царев В.Н.	SPIN: 8180–4941; ORCID: 0000–0002–3311–0367
Мкртумян А.М.	SPIN: 1980–8700; ORCID: 0000–0003–1316–5245
Эльбекьян К.С.	SPIN: 2403–8663; ORCID: 0000–0003–2403–8663
Караков К.Г.	SPIN: 7085–4329; ORCID: 0000–0001–9012–4784
Арутюнов С.Д.	SPIN: 1052–4131; ORCID: 0000–0001–6512–8724

Corresponding author: Balmasova Irina – MD., Professor, Head of the laboratory of pathogenesis and methods of treatment of infectious diseases of A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine&Dentistry, 105275, Russia, Moscow, 8th Street of Sokolinaya Gora, 15. E-mail: iri.balm@mail.ru

Unanyan K.G.	ORCID: 0000–0002–9109–8431
Balmasova I.P.	ORCID: 0000–0001–8194–2419
Tsarev V.N.	ORCID: 0000–0002–3311–0367
Mkrtyumyan A.M.	ORCID: 0000–0003–1316–5245
Elbekyan K.S.	ORCID: 0000–0003–2403–8663
Karakov K.G.	ORCID: 0000–0001–9012–4784
Arutyunov S.D.	ORCID: 0000–0001–6512–8724

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
CLINICAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-338-344
УДК 612.816

Эффект супраспинальных влияний на проявление пресинаптического торможения Ia афферентов при разных типах мышечного сокращения у человека

С.М. Богданов, Д.А. Гладченко, Л.В. Рощина, А.А. Челноков

Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, г. Великие Луки, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Биологическая роль пресинаптического торможения заключается в регуляции чрезмерного возбуждения скелетных мышц, препятствующего реализации произвольного мышечного сокращения. В современной литературе имеются сведения, посвященные в основном изучению различных видов спинального торможения при изометрическом типе сокращения. *Цель исследования:* определение роли супраспинальных влияний от стволовых структур головного мозга на активность пресинаптического торможения при выполнении различных по типу и величине мышечных сокращений у человека. *Материалы и методы:* в исследовании участвовали 6 добровольцев мужского пола в возрасте 20–22 лет. Регистрация пресинаптического торможения осуществлялась в состоянии покоя; при выполнении приема Ендрассика в покое; при выполнении концентрического, эксцентрического, изометрического сокращений в 50 % и 100 % от индивидуального максимума на фоне приема Ендрассика и без него. *Результаты:* во время выполнения различных по типу и величине мышечных сокращений выраженность пресинаптического торможения ослабевала по сравнению с покоем как без приема Ендрассика, так и на фоне его выполнения. С увеличением силы концентрических, эксцентрических и изометрических сокращений от 50 % до 100 % индивидуального максимума выраженность пресинаптического торможения прогрессивно уменьшалась в тех же экспериментальных условиях. Без приема Ендрассика самый большой эффект пресинаптического торможения регистрировался при концентрических и изометрических сокращениях в 50 % и 100 % от МПС, а на фоне выполнения приема Ендрассика – при изометрическом типе сокращения в 50 % и 100 % от МПС. Таким образом, супраспинальные нисходящие влияния, вызываемые приемом Ендрассика, модулируют состояние пресинаптического торможения первичных афферентов в зависимости от типа и силы мышечного сокращения.

Ключевые слова: пресинаптическое торможение, Н-рефлекс, концентрическое сокращение, эксцентрическое сокращение, изометрическое сокращение, прием Ендрассика, максимальное произвольное сокращение (МПС)

Вклад авторов. Все авторы – разработка, проведение исследования; С.М. Богданов и Д.А. Гладченко – сбор и обработка материалов; все авторы – анализ полученных данных, написание текста.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют, что исследование проводилось при отсутствии какого-либо конфликта интересов.

© Богданов С.М., Гладченко Д.А., Рощина Л.В., Челноков А.А., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Поступила 13.07.2020. Принята 04.09.2020.

Для цитирования: Богданов С.М., Gladchenko Д.А., Рощина Л.В., Челноков А.А. Эффект супраспинальных влияний на проявление пресинаптического торможения Ia афферентов при разных типах мышечного сокращения у человека // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 338–344. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-338-344

Effect of supraspinal influences on the manifestation of presynaptic inhibition Ia afferents in different types of muscle contraction in humans

S. Bogdanov, D. Gladchenko, L. Roshchina, A. Chelnokov

Velikie Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikie Luki, Russian Federation

Annotation. Relevance. The biological role of presynaptic inhibition is to regulate excessive skeletal muscle tone, which prevents the execution of arbitrary muscle contractions. In the modern literature, there is information devoted mainly to the study of various types of spinal inhibition in the isometric type of contraction. *The aim:* determining the role of supraspinal influences from brain stem structures on the activity of presynaptic inhibition when performing various types and sizes of muscle contractions in humans. *Materials and methods:* 20–22 year-old healthy men (n=6) took part in the research. Presynaptic inhibition was registered at rest; at rest in combination with the performance of Jendrassik maneuver; when performing concentric, eccentric, isometric contractions of 50% and 100% of the individual maximum without and against the background of Jendrassik maneuver. *Results:* During the execution of concentric, eccentric and isometric contractions of different sizes, the severity of presynaptic inhibition decreases in comparison with rest, both without taking Jendrassik maneuver, and against the background of its execution. With an increase in the strength of concentric, eccentric, and isometric contractions from 50% to 100% of the individual maximum, the severity of presynaptic inhibition progressively decreased under the same experimental conditions. Without taking Jendrassik maneuver, the greatest severity of presynaptic inhibition was observed with concentric and isometric contractions of 50% and 100% of the MVC, and against the background of taking Jendrassik maneuver – with an isometric type of reduction of 50% and 100% of the MVC. *Conclusion.* Supraspinal descending effects caused by the Jendrassik maneuver modulate the state of presynaptic inhibition Ia of the afferents of the flexor muscle of the foot, depending on the type and strength of muscle contraction.

Key words: presynaptic inhibition, H-reflex, concentric contraction, eccentric contraction, isometric contraction, Jendrassik maneuver, maximum voluntary contraction (MVC)

Author contributions. All authors – development and research; S.M. Bogdanov and D.A. Gladchenko – collection and processing of materials; all authors – analysis of the data received, writing the text.

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

Received 13.07. 2020. Accepted 04.09.2020

For citation: Bogdanov S., Gladchenko D., Roshchina L., Chelnokov A. Effect of supraspinal influences on the manifestation of presynaptic inhibition Ia afferents in different types of muscle contraction in humans. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4): 338–344. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-338-344

Основными нейрональными механизмами координационной и интегративной деятельности являются процессы торможения в спинном мозге, которые имеют важную функциональную значимость в регуляции двигательной активности и локомоторных движений [1–4]. Биологическая роль пресинаптического торможения заключается в регуляции чрезмерного возбуждения скелетных мышц, препятствующего реализации произвольного мышечного сокращения [5–8].

Известно, что для активации стволовых структур головного мозга и вызова неспецифических изменений в активности спинальных мотонейронов, а также процессов торможения используют кондиционирующие раздражения, например, аудиостимуляцию, произвольное мышечное сокращение мышц верхних и нижних конечностей или жевательных мышц (прием Ендрассика), ментальные (математические) задачи [9–14].

Вместе с тем в современной литературе имеются сведения, посвященные в основном изучению различных видов спинального торможения при изометрическом типе сокращения мышц [15, 16]. Авторами установлено, что в процессе выполнения изометрического сокращения пресинаптическое торможение первичных афферентов камбаловидной мышцы более усилено по сравнению с постсинаптическими тормозными механизмами (реципрокного и нереципрокного торможения). Поэтому в нашей работе изучена роль нисходящих влияний в проявлении пресинаптического торможения при разных типах и силе мышечного сокращения у человека.

Материалы и методы

Участники исследования. В исследовании приняли участие 6 мужчин в возрасте 20–22 лет, физически активных, без каких-либо отклонений в состоянии здоровья; все относились к основной медицинской группе. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Участники исследования дали письменное разрешение на обработку персональных данных.

Методика регистрации пресинаптического торможения гомонимных Ia афферентов. Каждому участнику исследования наносились кондиционирующие (n. peroneus profundus) и тестирующие стимулы (n. tibialis) с межстимульным интервалом 100 мс. Кондиционирующий стимул подавляет тестирующий Н-ответ m. soleus, вызывая на спинальном уровне изменения в активности пресинаптического торможения [17] (рис. 1А). Контрольный Н-рефлекс использовался для определения выраженности пресинаптического торможения, которая вычислялась по формуле: Амплитуда тестирующего Н-ответа / Амплитуда контрольного Н-ответа × 100. Выраженность пресинаптического торможения оценивалась по наибольшей величине подавления тестирующего Н-рефлекса, в%.

Сила контрольного и тестирующего стимулов на n. tibialis составляла 15–25 % от максимального Н-ответа m. soleus, а кондиционирующего раздражения на n. peroneus profundus – 5–15 % максимального М-ответа той же мышцы. На миниэлектромиографе с программным обеспечением Муо разработчиков АНО ИМР «Возращение» (Санкт-Петербург, 2003) регистрировали амплитуды Н-рефлексов и М-ответов, осуществляли кондиционирующую стимуляцию и тестирующее раздражение афферентов Ia, проводили запись ЭМГ-активности мышц-антагонистов (m. soleus, m. tibialis anterior) [2].

Регистрация концентрического, эксцентрического, изометрического сокращений. Во всех исследованиях участники находились в положении сидя на комплексе «Biodex Multi-Joint System Pro-3», на подголовнике кресла располагалась голова, кисти рук произвольно лежали на поверхности брюшной полости; жестко фиксировали коленный сустав при угле 110° и голеностопный сустав, который сохранялся подвижным, а стопа опиралась на педаль. Всем участникам исследования предлагалось выполнить сокращения в 100 % и 50 % от МПС (рис. 1Б).

Преодолевающее (концентрическое) сокращение в голеностопном суставе выполнялось от угла в –30°, а заканчивалось при угле +30°, а уступающее (эксцентрическое) сокращение – от угла +30°,

а завершалось при угле -30° . Диапазон движения в голеностопном суставе при обоих МПС составлял 60° , которое участник исследования совершал за 2 секунды. При суставных углах в -30° , 90° , $+30^\circ$ участник исследования выполняли изометрический тип сокращения (рис. 1Б).

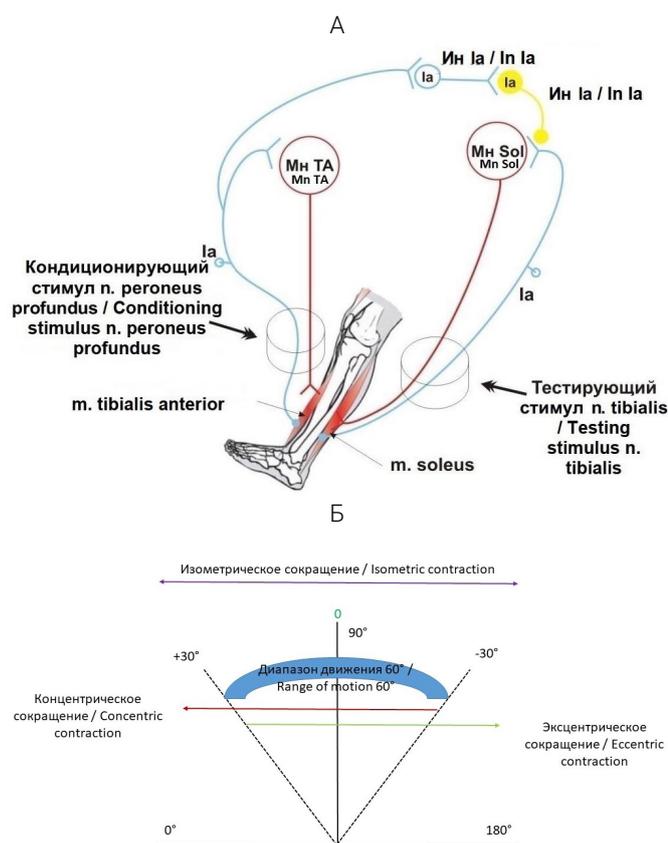


Рис. 1. А: Методика регистрации пресинаптического торможения первичных афферентов m. soleus (схема); Б: Схема выполнения концентрического, эксцентрического и изометрического сокращения мышц голени

Fig. 1. A: Schematic description of the method for evaluating presynaptic inhibition of afferents Ia m. soleus; B: Scheme for performing concentric, eccentric and isometric contractions of the lower leg muscles

Прием Ендрассика (ПЕ). Для активации стволовых структур головного мозга и вызова неспецифических изменений в активности пресинаптического торможения в спинном мозге применялся прием Ендрассика [9, 18], который подразумевает произвольное изометрическое сокращение сцепленных рук.

Регистрацию пресинаптического торможения осуществляли в следующих условиях: 1) в состоянии покоя (ПОКОЙ); 2) в состоянии покоя в сочетании с выполнением приема Ендрассика (ПОКОЙ+ПЕ); 3) при выполнении концентрического, эксцентрического, изометрического сокращений в 50 % и 100 % от индивидуального максимума без приема Ендрассика (50 % от МПС; 100 % от МПС); 4) при выполнении концентрического, эксцентрического, изометрического сокращений 50 % и 100 % от индивидуального максимума на фоне приема Ендрассика (50 % от МПС+ПЕ; 100 % от МПС+ПЕ).

Для оценки достоверных различий между показателями при соблюдении разных условий использовался дисперсионный анализ Kruskal-Wallis test (Statistica 12.5, USA). Статистическая значимость была установлена на уровне $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате исследования установлено, что во время осуществления приема Ендрассика в покое пресинаптическое торможение ослабевало, что выражалось в достоверном повышении амплитуды тестирующего Н-ответа m. soleus от контрольного рефлекса (рис. 2А, Б; $P < 0,05^\#$). Во время выполнения концентрических, эксцентрических и изометрических сокращений, разных по величине, выраженность пресинаптического торможения снижалась по сравнению с относительным мышечным покоем, как без приема Ендрассика (рис. 2А; $P < 0,05^*$, ** , ***), так и на фоне его выполнения (рис. 2Б; $P < 0,05^*$, ** , ***). Следует отметить, что с увеличением силы концентрических, эксцентрических и изометрических сокращений от 50 % до 100 % индивидуального максимума активность пресинаптического торможения прогрессивно уменьшалась в тех же экспериментальных условиях (рис. 2А, Б; $P < 0,05^\#$).

На фоне выполнения приема Ендрассика в сочетании с концентрическим сокращением в 50 % от МПС, эксцентрическим сокращением в 50 % и 100 % от МПС, изометрическим сокращением в 50 % и 100 % от МПС выраженность пресинаптического торможения ослабевала по сравнению с показателями без приема Ендрассика (рис. 2Б; $P < 0,05^+$).

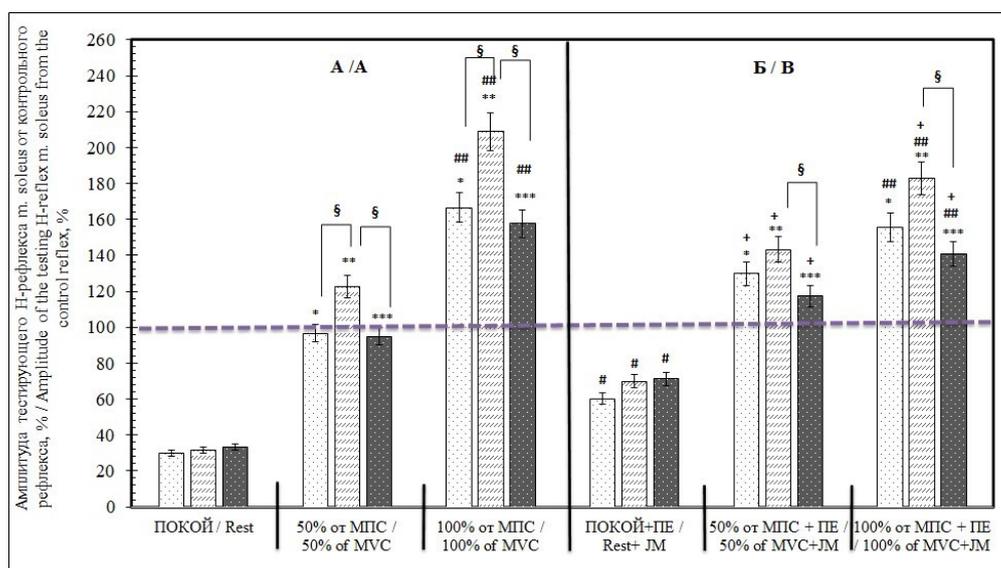


Рис. 2. Амплитуда тестирующего Н-рефлекса m. soleus от контрольного рефлекса в разных экспериментальных условиях, %.

Примечание: # – достоверность различий в показателях между приемом Ендрассика (Б) и состоянием относительного мышечного покоя (А); *, **, *** – достоверность различий в показателях при разных типах сокращений в 50 % от МПС и 100 % от МПС без (А) и с приемом Ендрассика (Б) по отношению к состоянию относительного мышечного покоя (А); ## – достоверность различий в показателях разных типов сокращения в 50 % от МПС по отношению к 100 % от МПС без (А) и с приемом Ендрассика (Б); + – достоверность различий в показателях при разных типах сокращений в 50 % от МПС и 100 % от МПС без (А) и с приемом Ендрассика (Б); § – достоверность различий в выраженности пресинаптического торможения при экспериментальных условиях (А, Б) (Kruskal-Wallis Anova).

Fig. 2. Amplitude of the testing H-reflex soleus muscle from the control reflex in different experimental conditions, %

Notes: # – reliability of differences in performance between Jendrassik maneuver (B) and the state of relative muscular rest (A); *, **, *** – the significance of differences in performance when different types of contractions in 50 % of the MVC and 100 % of the MVC without (A) and the Jendrassik maneuver (B) in relation to the state of relative muscular rest (A); ## – reliability of differences in performance of different types of reducing 50 % of the MVC in relation to 100 % of the MVC without (A) and with the Jendrassik maneuver (B); + – reliability of differences in performance when different types of contractions in 50 % of the MVC and 100 % of the MVC without (A) and the Jendrassik maneuver (B); § – reliability of differences in the severity of presynaptic inhibition under different experimental conditions (A, B) (Kruskal-Wallis Anova).

Сопоставительный анализ проявления пресинаптического торможения при разных типах сокращения показал, что без приема Ендрассика наибольшее его проявление наблюдалось при выполнении концентрических и изометрических сокращений в 50 % и 100 % от МПС (рис. 2А; $P < 0,05^{\S}$) по сравнению с эксцентрическим сокращением, а на фоне выполнения приема Ендрассика – только при изометрическом типе сокращения в 50 % и 100 % от МПС (рис. 2Б; $P < 0,05^{\S}$).

Результаты исследования влияния супраспинальных нисходящих путей на пресинаптическое

торможение первичных афферентов m. soleus показали, что с увеличением силы концентрических, эксцентрических и изометрических сокращений от 50 % до 100 % индивидуального максимума на фоне приема Ендрассика пресинаптическое торможение прогрессивно уменьшается. П. Зер и Р.Б. Штейн также показали, что при умеренном подошвенном сгибании в 10 % от индивидуального максимума совместно с приемом Ендрассика активность пресинаптического торможения первичных афферентов m. soleus снижается [19]. Авторы предполагают, что на снижение пресинаптического торможения при выполнении

подошвенного сгибания стопы оказывают влияния нисходящих супраспинальных путей ретикулярной формации продолговатого мозга, активируемые приемом Ендрассика [20, 21]. Также о снижении активности пресинаптического торможения первичных афферентов *m. gastrocnemius med.*, вызываемого вибростимуляцией *tendo calcaneus*, в условиях реализации разного по силе и величине изометрического сокращения изложены нами ранее [22].

Наряду с этим выполнение концентрических, эксцентрических и изометрических сокращений, разных по силе, сопровождалось прогрессивным ослаблением пресинаптического торможения по сравнению с относительным мышечным покоем, как без приема Ендрассика, так и на фоне его выполнения. Возможно, это связано с тем, что в процессе выполнения произвольного движения вносят вклад не только восходящие афферентные влияния с периферии, но и нисходящие кортико- и ретикулоспинальные влияния на интернейроны Ia пресинаптического торможения.

В свою очередь, сравнительный анализ проявления пресинаптического торможения Ia афферентов *m. soleus* при разных типах сокращения в 50% и 100% от индивидуального максимума позволил установить различия в активности супраспинальных нисходящих структур, активируемых приемом Ендрассика. Показано, что на фоне выполнения приема Ендрассика наибольшая выраженность пресинаптического торможения отмечается при выполнении изометрического сокращения в 50% и 100% от МПС, а без приема Ендрассика – при концентрических и изометрических сокращениях в 50% и 100% от МПС. Однако мы не наблюдали различий в проявлении пресинаптического торможения на фоне приема Ендрассика в сочетании с концентрическим и изометрическим сокращениями в 50% и 100% от индивидуального максимума. Данный факт указывает, что при концентрическом и изометрическом сокращениях на фоне приема Ендрассика вовлекаются одни и те же центральные механизмы регуляции пресинаптической тормозной системы.

Таким образом, можно сделать заключение, что супраспинальные нисходящие влияния, вызываемые приемом Ендрассика, модулируют состояние пресинаптического торможения первичных афферентов в зависимости от типа и силы мышечного сокращения.

Библиографический список

1. Бикмуллина Р.Х., Розенталь А.Н., Плецинский И.Н. Тормозные системы спинного мозга в контроле взаимодействий функционально сопряженных мышц. *Физиология человека*. 2007. Том 33. № 1. С. 119–130.
2. Челноков А.А., Гладченко Д.А., Федоров С.А., Городничев Р.М. Возрастные особенности спинального торможения скелетных мышц у лиц мужского пола в регуляции произвольных движений. *Физиология человека*. 2017. Т. 43. № 1. С. 35–44.
3. Pierrot-Deseilligny E., Burke D. *The Circuitry of the Human Spinal Cord: Spinal and Corticospinal Mechanisms of Movement*. – United States: Cambridge University Press. 2012. 606 p.
4. Moreno-López Y., Olivares-Moreno R., Cordero-Erausquin M., Rojas-Piloni G. Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat*. 2016. V. 9. P. 10–24.
5. Rudomin P., Schmidt R.F. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp. Brain Res*. 1999. V. 129. P. 1–37.
6. Rudomin P. In search of lost presynaptic inhibition. *Exp. Brain Res*. 2009. V. 196(1). P. 139–151.
7. Попова И.Е., Сысоев А.В. Функциональные особенности Н-рефлекса спортсменов ав. различных специализаций в годичном цикле тренировок. *Ученые записки университета имени П.Ф. Лесгафта*. 2015. № 4(122). С. 156–159.
8. Earles D.R., Dierking J.T., Robertson C.T., Koceja D.M. Pre- and post-synaptic control of motoneuron excitability in athletes. *Journal of Med. Sci. Sports Exerc*. 2002. V. 34. P. 66–72.
9. Гурфинкель В.С. Прием Ендрассика создает условия для запуска произвольных шагательных движений. *Физиология человека*. 2000. Т. 26. № 2. С. 73–79.
10. Яфарова Г.Г., Балтина Т.В., Плецинский И.Н. Функциональное состояние двигательных центров спинного мозга в условиях его травматического повреждения. *Нижекамск: Изд-во НФ МГЭИ*. 2008. 74 с.
11. Knikou M. The H-reflex as a probe: Pathways and pitfalls. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008. V. 171. P. 1–12.
12. Selionov V.A. Tonic central and sensory stimuli facilitate involuntary air-stepping in humans. *J. Neurophysiol*. 2009. V. 101. № 6. P. 2847–2858.
13. Selionov V.A. Lack of non-voluntary stepping responses in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2013. V. 235. P. 96–108.
14. Sylos-Labini F. Locomotor-like leg movements evoked by rhythmic arm movements in humans. *PLoS One*. 2014. V. 9. № 3. e90775.
15. Челноков А.А., Бучацкая И.Н. Функциональные особенности спинального торможения человека при произвольной двигательной активности. *Теория и практика физической культуры*. 2015. № 6. С. 11–13.
16. Челноков А.А., Кошкарев Л.Т., Челнокова М.И. Особенности спинального торможения при произвольной двигательной активности мышц голени у лиц, занимающихся физической культурой и спортом. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2017. Т. 7. № 1. С. 5–13.
17. Mizuno Y., Tanaka R., Yanagisawa N. Reciprocal group I inhibition of triceps surae motoneurons in man. *Journal of Neurophysiology*. 1971. V.34. P. 1010–1017.
18. Jendrassik E. Beiträge zur Lehre von den Sehnenreflexen. *Deutsche Archiv für Klinische Medizin*. 1883. V. 33. P. 177–199.
19. Zehr E.P., Stein R.B. Interaction of the Jendrassik maneuver with segmental presynaptic inhibition *Exp Brain Res*. 1999. V. 124. P. 474–480
20. Dowman R., Wolpaw J.R. Jendrassik maneuver facilitates soleus H-reflex without change in average soleus motoneuron pool membrane potential. *Exp Neurol*. 1988. V. 101(2). P. 288–302.

21. Gregory J.E., Wood S.A., Proske U. An investigation into mechanisms of reflex reinforcement by the Jendrassik manoeuvre. *Exp Brain Res*. 2001. V. 138. P. 366–374.
22. Гладченко Д.А., Челноков А.А., Дробыш А.С. Влияние неспецифической активации ствольных структур головного мозга на выраженность пресинаптического торможения при произвольных движениях // Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова. Воронеж: Изд-во «ИСТОКИ». 2017. С. 2025–2026.

References

1. Bikmullina R.H., Rozental' A.N., Pleshchinskij I.N. Tormoznye sistemy spinного mozga v kontrole vzaimodejstvij funkcional'no sopryazhyonnyh myshc. *Fiziologiya cheloveka*. 2007;33(1):119–130. (In Russ).
2. Chelnokov A.A., Gladchenko D.A., Fedorov S.A., Gorodnichev R.M. Vozrastnye osobennosti spinal'nogo tormozheniya skeletnyh myshc u lic muzhskogo pola v regulyacii proizvol'nyh dvizhenij. *Fiziologiya cheloveka*. 2017;43(1):35–44. (In Russ).
3. Pierrot-Deseilligny E., Burke D. *The Circuitry of the Human Spinal Cord: Spinal and Corticospinal Mechanisms of Movement*. United States: Cambridge University Press. 2012. 606 p.
4. Moreno-López Y., Olivares-Moreno R., Cordero-Erausquin M., Rojas-Piloni G. Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat*. 2016;9:10–24.
5. Rudomin P., Schmidt R.F. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp. Brain Res*. 1999;129:1–37.
6. Rudomin P. In search of lost presynaptic inhibition. *Exp. Brain Res*. 2009;196(1):139–151.
7. Popova I.E., Sysoev A.V. Funkcional'nye osobennosti N-refleksa sportsmenov razlichnyh specializacij v godichnom cikle trenirovok. *Uchenye zapiski universiteta imeni P.F. Lesgafta*. 2015;4(122):156–159. (In Russ).
8. Earles D.R., Dierking J.T., Robertson C.T., Koceja D.M. Pre- and post-synaptic control of motoneuron excitability in athletes. *Journal of Med. Sci. Sports Exerc*. 2002;34:66–72.
9. Gurfinkel' V.S. Priem Endrassika sozdaet usloviya dlya zapuska neproizvol'nyh shagatel'nyh dvizhenij. *Fiziologiya cheloveka*. 2000;26(2):73–79. (In Russ).
10. Yafarova G.G., Baltina T.V., Pleshchinskij I.N. Funkcional'no e sostoyanie dvigatel'nyh centrov spinного mozga v usloviyah ego travmaticheskogo povrezhdeniya. Nizhnekamsk: Izd-vo NF MGEl. 2008. 74 p. (In Russ).
11. Knikou M. The H-reflex as a probe: Pathways and pitfalls. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008;171:1–12.
12. Selionov V.A. Tonic central and sensory stimuli facilitate involuntary air-stepping in humans. *J. Neurophysiol*. 2009;101(6):2847–2858.
13. Selionov V.A. Lack of non-voluntary stepping responses in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2013;235:96–108.
14. Sylos-Labini F. Locomotor-like leg movements evoked by rhythmic arm movements in humans. *PLoS One*. 2014;9(3): e90775.
15. Chelnokov A.A., Buchackaya I.N. Funkcional'nye osobennosti spinal'nogo tormozheniya cheloveka pri proizvol'noj dvigatel'noj aktivnosti. *Teoriya i praktika fizicheskoy kul'tury*. 2015;6:11–13. (In Russ).
16. Chelnokov A.A., Koshkarev L.T., Chelnokova M.I. Osobennosti spinal'nogo tormozheniya pri proizvol'noj dvigatel'noj aktivnosti myshc goleni u lic, zanimayushchihsya fizicheskoy kul'turoj i sportom. *Sportivnaya medicina: nauka i praktika*. 2017;7(1):5–13. (In Russ).
17. Mizuno Y., Tanaka R., Yanagisawa N. Reciprocal group I inhibition of triceps surae motoneurons in man. *Journal of Neurophysiology*. 1971;34:1010–1017.
18. Jendrassik E. Beiträge zur Lehre von den Sehnenreflexen. *Deutsche Archiv für Klinische Medizin*. 1883;33:177–199.
19. Zehr E.P., Stein R.B. Interaction of the Jendrassik maneuver with segmental presynaptic inhibition. *Exp Brain Res*. 1999;124:474–480.
20. Downman R., Wolpaw J.R. Jendrassik maneuver facilitates soleus H-reflex without change in average soleus motoneuron pool membrane potential. *Exp Neurol*. 1988;101(2):288–302.
21. Gregory J.E., Wood S.A., Proske U. An investigation into mechanisms of reflex reinforcement by the Jendrassik manoeuvre. *Exp Brain Res*. 2001;138:366–374.
22. Gladchenko D.A., Chelnokov A.A., Drobysch A.S. Vliyanie nespecificheskoj aktivacii stvolovyh struktur golovного mozga na vyrazhennost' presinapticheskogo tormozheniya pri proizvol'nyh dvizheniyah. *Materialy XXIII s'ezda Fiziologicheskogo obshchestva imeni I.P. Pavlova*. Voronezh: Izd-vo «ISTOKI». 2017. P. 2025–2026. (In Russ).

Ответственный за переписку: Челноков Андрей Алексеевич – д. б. н., заведующий кафедрой естественно-научных дисциплин, профессор, ФГОУ ВО Великолукская государственная академия физической культуры и спорта; 182105, Россия, Псковская область, г. Великие Луки, пл. Юбилейная, д. 4. E-mail: and-chelnokov@yandex.ru

Челноков А.А. SPIN: 4706–8513, ORCID ID: 0000–0003–0502–5752

Гладченко Д.А. SPIN: 7541–0760, ORCID ID: 0000–0001–6041–3614

Рощина Л.В. SPIN-код: 6287–8630, ORCID ID: 0000–0002–7647–2106

Богданов С.М. SPIN-код: 2076–9689, ORCID ID: 0000–0003–2543–6890

Corresponding author: Chelnokov Andrei – professor, head of the department of natural sciences of Velikie Luki State Academy of Physical Education and Sports; 182105, Russia, Velikie Luki, Yubileynaya, 4, E-mail: and-chelnokov@yandex.ru

Chelnokov A. ORCID ID: 0000–0003–0502–5752

Gladchenko D. ORCID ID: 0000–0001–6041–3614

Roshchina L. ORCID ID: 0000–0002–7647–2106

Bogdanov S. ORCID ID: 0000–0003–2543–6890

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ
CLINICAL PHYSIOLOGY. REVIEW

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-345-353

Типологические особенности головного мозга в норме и при церебральной гипоперфузии

В.В. Криштоп¹, Т.А. Румянцева², В.Г. Никонорова³

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Российская Федерация

³ Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени Д.К. Беляева, Иваново, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Стрессоустойчивость и когнитивные способности пациента, формируя личностную компоненту реабилитационного потенциала, оказывают значимое влияние на протекание и восстановительный период после церебральной гипоксии, разного генеза. Адаптация реабилитационных мероприятий к индивидуальным особенностям пациента значительно повышает эффективность реабилитационных мероприятий при инсульте и нейродегенеративных заболеваниях. *Цель работы:* обобщить экспериментальные и клинические исследования, характеризующие влияние индивидуальных особенностей высшей нервной деятельности на протекание церебральной гипоперфузии. *Материалы и методы.* Произведено исследование литературных источников наукометрических научных баз за последние 15 лет. *Результаты.* Уровень стрессоустойчивости имеет в своей основе альтернативные биохимические стратегии нейронального метаболизма макроэргов, нейромедиаторов. На организменном уровне это реализуется в большем базовом напряжении стрессактивирующей системы и меньшей резервной емкости симпатoadреналовой системы и приводит к более тяжелому протеканию церебральной гипоперфузии у стресснеустойчивых индивидуумов и более медленному восстановлению. Уровень стрессоустойчивости взаимосвязан с высоким базовым тонусом симпатической нервной системы, концентрацией инсулина и тестостерона. Вместе с тем низкий уровень стрессоустойчивости определяет большую чувствительность к экзогенным корригирующим влияниям при церебральной гипоперфузии. Уровень когнитивных способностей ассоциирован с астроцитарными реакциями и организацией синаптических ансамблей. Участие астроцитов в регуляции уровня глутамата, вероятно, оказывает комбинированное влияние, как на состояние когнитивных механизмов, так и на повреждение компонентов нейро-глиальных ансамблей при гипоксии и обусловлено высвобождением $S100\beta^+$, что, в свою очередь, усиливает скоординированные колебания нейронов в медиальной префронтальной коре и гиппокампе и может быть причиной большего повреждения клеток коры больших полушарий головного мозга у животных с высоким уровнем когнитивных способностей в модели церебральной гипоперфузии.

Ключевые слова: церебральная гипоперфузия, стрессоустойчивость, когнитивные способности, головной мозг

Вклад авторов. Криштоп В.В., Румянцева Т.А. – концепция и дизайн исследования; Криштоп В.В., Никонорова В.Г. – сбор и обработка материалов; Криштоп В.В., Румянцева Т.А. – анализ полученных данных, написание текста.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© Криштоп В.В., Румянцева Т.А., Никонорова В.Г., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Поступила 07.08.2020. Принята 04.09.2020.

Для цитирования: Криштон В.В., Румянцева Т.А., Никонорова В.Г. Типологические особенности головного мозга в норме и при церебральной гипоперфузии // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 345–353. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-345-353

Typological features of the brain in normal conditions and in cerebral hypoperfusion

V.V. Chrishtop¹, T.A. Rumyantseva², V.G. Nikonorova³

¹ ITMO University, Russian Federation

² Yaroslavl State Medical University, Russian Federation

³ Ivanovo State Agricultural Academy named after D.K. Belyaev, Russian Federation

Annotation. Relevance. Stress resistance and cognitive abilities of the patient, forming the personal component of the rehabilitation potential, have a significant impact on the course and recovery period after cerebral hypoxia of various origins. The adaptation of rehabilitation measures to the individual characteristics of the patient will significantly increase the effectiveness of rehabilitation measures for stroke and neurodegenerative diseases. *The aim* of this work is to generalize experimental and clinical studies characterizing the influence of individual characteristics of higher nervous activity on the course of cerebral hypoperfusion. *Materials and methods.* The study of literary sources of scientometric scientific bases for the last 15 years has been carried out. *Results.* The level of stress resistance is based on alternative biochemical strategies of neuronal metabolism of macroergs and neurotransmitters. At the organismic level, this is realized in a greater base voltage of the stress-activating system and a smaller reserve capacity of the sympathoadrenal system. In general, this leads to more severe cerebral hypoperfusion in stress-resistant individuals and slower recovery and is correlated with a high baseline sympathetic nervous system tone, insulin and testosterone concentrations. At the same time, a low level of stress resistance determines a greater sensitivity to exogenous corrective influences in cerebral hypoperfusion. The level of cognitive ability is associated with astrocytic responses and the organization of synaptic ensembles. The participation of astrocytes in the regulation of glutamate levels probably has a combined effect on both the state of cognitive mechanisms and damage to the components of neuroglial assemblies during hypoxia. This is also due to the release of S100 β +, which, in turn, enhances the coordinated oscillations of neurons in the medial prefrontal cortex and hippocampus and may be the cause of greater damage to the cells of the cerebral hemispheres of the brain in animals with a high level of cognitive abilities in the cerebral hypoperfusion model.

Key words: cerebral hypoperfusion, stress resistance, cognitive abilities, brain

Authors contributions: Chrishtop V.V., Rumyantseva T.A.—research concept and design; Chrishtop V.V., Nikonorova V.G.—collection and processing of materials; Chrishtop V.V., Rumyantseva T.A.—analysis of the received data, writing the text.

Conflict of Interest Statement. The authors declare that the research was conducted in the absence of any conflict of interest. Received 07.08.2020. 2020. Accepted 04.09.2020.

For citation: Chrishtop V.V., Rumyantseva T.A., Nikonorova V.G. Typological features of the brain in normal conditions and in cerebral hypoperfusion. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):345–353. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-345-353

Реабилитационный потенциал характеризует вероятность достижения намеченных медицинских целей в намеченный отрезок времени реабилитации, с учетом характера патологии, ее течения, и ин-

дивидуальных компенсаторных возможностей [1]. Реабилитационный потенциал рассматривается на трех уровнях: биологическом, личностном и социальном [2]. Особый интерес представляет оценка

индивидуальных особенностей организма не только после, но и до гипоксического повреждения головного мозга. Адекватным средством решения данной задачи является изучение в экспериментальных моделях церебральной гипоперфузии состояния высшей нервной деятельности, в том числе когнитивных способностей и уровня стрессоустойчивости у крыс [3]. Адаптация реабилитационных мероприятий индивидуальным особенностям пациента значительно повышает эффективность реабилитационных мероприятий при инсульте и нейродегенеративных заболеваниях.

Цель работы: обобщить экспериментальные и клинические исследования, характеризующие влияние индивидуальных особенностей высшей нервной деятельности на протекание церебральной гипоперфузии. Произведено исследование литературных источников наукометрических научных баз за последние 15 лет.

Стрессоустойчивость

Приоритет в формировании концепции высокого (ВУС) и низкого уровня стрессоустойчивости (НУС) принадлежит школе Е.В. Коплик, установившей, что валидация в тесте «открытое поле» активных и пассивных по поведению аутобредных крыс Вистар [4] соответствует устойчивости крыс к стрессорным нагрузкам [5]. Животные с ВУС характеризуются повышенным уровнем инсулина и тестостерона и сниженным уровнем кортикостерона в плазме крови по сравнению с поведенчески пассивными (НУС) крысами [6]. Выключение базомедиальной миндалины у животных с ВУС повышает уровень тироксина (на 21%) и снижает его у НУС (на 51%) [6]. В условиях стресса реципрокность в отношении вещества П больше выражена у крыс с ВУС, а в отношении бета-эндорфина – у крыс с НУС [7]. В ретикулярной формации среднего мозга животных с уровнем стрессоустойчивости связан с повышенным уровнем обмена одного из нейромедиаторов: дофамина или норадреналина [8].

У животных с НУС локальный мозговой кровоток ниже, чем у ВУС крыс, при достоверно более высокой нейрональной активности [9]. Метаболизм нейронов также имеет свои особенности, заключающиеся в преобладании системы акцепторов водорода (НАД + НАДН) над системой макроэргов

(АТФ и креатинфосфата) [10], повышении активности креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в мозге НУС животных, исходно большим напряжением стресс-активирующей системы и меньшей резервной емкости симпатoadrenalовой системы [11].

При церебральной гипоперфузии первыми реагируют соматотропоциты и адренкортикотропоциты аденогипофиза и кортикоциты пучковой зоны надпочечников [12, 13]. Уже через 3 часа после перевязки обеих сонных артерий у крыс наблюдался подъем кортизола в 1,4 раза [14]. Выраженность гормонального отклика – стресс-реактивность имеет важное прогностическое значение, поскольку повышенный уровень кортизолемии прямо коррелирует с исходом ишемической энцефалопатии, развивающейся после острой церебральной гипоксии [15], и уровнем повреждения нейронов коры [16]. Именно влияние индивидуальных особенностей может объяснить отсутствие в ряде случаев параллелизма между тяжестью изменений внутренних сонных артерий и нарушением гемодинамического резерва [17, 18].

После одностороннего гемморагического инсульта ВУС крыс был ассоциирован с более полноценным неврологическим статусом, и уменьшением локомоторных и координационных нарушений по отношению к показателям НУС животных, на седьмые сутки эксперимента [19]. У НУС животных третьи сутки сопровождаются с наиболее тяжелыми неврологическими нарушениями, сопровождающимися двустороннюю перевязку общих сонных артерий. Это объясняется выраженным ростом концентрации малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и снижением активности каталазы, характеризующей качество антиоксидантной защиты. У животных с ВУС, напротив, снижение концентрации МДА сопровождался ростом каталазной активности. Вышеописанный комплекс биохимических перестроек характеризует устойчивую антиоксидантную систему защиты, профилактирующую развитие гемморрагического инсульта у животных с ВУС [20]. Также у НУС особей, после кровоизлияния в левом хвостатом ядре мозга, изменения сосудов и нейронов сенсомоторной коры более выражены, чем у ВУС крыс [21].

Динамика восстановления также отличается в зависимости от уровня стрессоустойчивости: 6 су-

ток спустя, после геморрагического инсульта у НУС крыс более выражены парасимпатические влияния на сердце. В процессе восстановления у них происходит рост симпатических влияний. У ВУС крыс, наоборот, в начале стресса преобладают симпатические влияния на сердце, однако в последующем их интенсивность снижается [23]. При церебральной гипоперфузии снижение когнитивных функций ассоциировано со снижением численной плотности астроцитов и количества главных отростков астроцитов, менее выраженное у животных с ВУС [24]. Во время геморрагического инсульта более интенсивное разрушение клеток в лимфоидных узлах характерно также для НУС крыс [22].

Исходная стрессоустойчивость способна определять эффективность лечебных мероприятий. Низкая стрессоустойчивость потенцирует дистрофические изменения, вызванные хроническим стрессом в печени, и снижает регенераторные [25], однако именно у этих крыс введение мелатонина в дозе 1 мг/кг приводит к снижению дистрофических изменений и стимулирует запуск регенераторных механизмов в клетках печеночных балок [26]. У пациентов с хронической ишемией головного мозга НУС ассоциирован с худшим прогнозом заболевания [27]. Этот прогноз позволяет снизить число осложнений за счет применения неспецифической цитопротективной терапии в группе риска [28].

Когнитивные способности

Оценка состояния когнитивных способностей у крыс является общепризнанной методикой в современных научных исследованиях [29, 30]. Вместе с тем подавляющее большинство исследований рассматривают состояние когнитивных функций не как конституциональную особенность индивида, а как производную структур головного мозга, изменившихся под влиянием церебральной гипоперфузии.

Исторически нейроны, а именно нейрональная сеть, сформированная их отростками, преимущественно дендритами [31, 32], рассматривается как основа когнитивной функции [33]. Высокий уровень ветвистости дендритов и наибольшая площадь дендритного поля характерна для индивидуумов с высшим образованием. Эти показатели значитель-

но снижены у лиц, имеющих среднее образование и минимальны при низком уровне образования [34]. Тем не менее, высокая степень ветвления дендритов не является следствием интенсивных умственных нагрузок, однако она ассоциирована с высоким образовательным уровнем [35].

Недавние исследования связывают передачу сигналов астроцитов на синаптических или сетевых уровнях с когнитивными характеристиками и предоставляют прямые доказательства того, что когнитивная обработка требует скоординированной активности синаптических ансамблей и астроцитов [36]. Стимулированные астроциты индуцируют локализованное увеличение внеклеточного глутамата, что увеличивает совместное возбуждение нейронов [37]. Так, они формируют синхронизирующий сигнал для нейронных ансамблей [38]. Существуют данные о том, что астроциты вносят важный вклад в формирование когнитивных способностей, путем высвобождения S100 β , белка, связывающего Ca²⁺, что, в свою очередь, усиливает скоординированные колебания нейронов в медиальной префронтальной коре [39], гиппокампе [40]. Кроме того, астроциты обладают способностью консолидировать память [41]. Вышеописанные исследования подкрепляются морфологическими открытиями, демонстрирующими более сложный характер астроцитарных сетей в структурах головного мозга, чем предполагалось до этого [42], а также более сложный популяционный состав астроцитов, с выраженными региональными различиями [43].

При церебральной гипоперфузии снижение численной плотности тел астроцитов и количества главных отростков, характеризующие альтерацию астроцитов у животных с (ВУК) более выражены в ранние сроки эксперимента (на 21-е сутки), а у животных с низким уровнем когнитивных (НУК) способностей в более поздние – на 90-е сутки. Развитие компенсаторной реакции в виде роста площади, занимаемой отростками астроцитов у животных с НУК, более выражено на 60-е сутки церебральной гипоперфузии, а у животных с ВУК в более поздние сроки – на 90-е сутки после моделирования [44]. Больше повреждением структур нейро-глиального ансамбля так же характерно для крыс с ВУК [45].

Взаимоотношения стрессоустойчивости и когнитивных процессов выявлены как в норме [46], так и при ряде заболеваний [47], в том числе и в экспериментальных моделях на крысах [48]. Такого рода корреляты объясняются модуляцией гормональными стероидными гормонами когнитивных процессов и высшей нервной деятельности в целом. Так снижение когнитивного статуса время беременности связываются с высокими уровнями эстрадиола и прогестерона [49, 50], эффектами стероидных гормонов на пролиферацию и дифференцировку нейрональных клеток [51], влиянием на плотность синаптических контактов и метаболизм нейромедиаторов [52].

При селекции крыс на высокие показатели решения теста на выявление когнитивных способностей было показано, что потомки животных, характеризующихся высокими показателями тестирования, обладали крайне высоким уровнем тревожности [53]. Однако также было показано, что повторяющиеся стресс-индуцированные депрессивные эпизоды в течение жизни крыс приводили к росту когнитивных способностей животных [54].

Таким образом, комплекс типологических особенностей (уровень стрессоустойчивости – когнитивные способности), обеспечивающих формирование реабилитационного потенциала, является комплексной сложно коррелированной системой, состояние которой необходимо учитывать для индивидуализации диагностики и лечения пациентов при церебральной гипоперфузии.

Выводы

1. Ущерб от возрастного снижения когнитивных функций, наиболее ощутим для высококвалифицированных категорий специалистов, с интенсивным режимом работы, на обучение и повышение квалификации которых затрачивается значительные средства и время. В связи с этим, высокую значимость приобретает поиск мер компенсации последствий церебральной гипоперфузии, включающий в себя повышение стрессоустойчивости индивида. При этом следует учитывать, исходный уровень стрессоустойчивости имеет в своей основе альтернативные биохимические стратегии нейронального метаболизма макроэргов, нейромедиаторов. Это определяет необходимость индивидуализированной

проводимой коррекции при ишемическом инсульте и нейродегенеративных заболеваниях.

2. Высокий уровень стрессоустойчивости ассоциирован с большим базовым напряжением стресс-активирующей системы.

3. Низкий уровень стрессоустойчивости определяет большую чувствительность к экзогенным корригирующим влияниям при церебральной гипоперфузии.

4. Последние годы в фокус многих исследователей сместился в сторону изучения глиальных и в том числе, астроцитарных адаптационно-компенсаторных механизмах при церебральной гипоперфузии. В таком контексте астроцит рассматривается в качестве терапевтической мишени, при разработке новых препаратов, с целью нейрональной протекции. Однако, участие астроцитов в регуляции уровня глутамата, вероятно, оказывает комбинированное влияние, как на состояние когнитивных механизмов, так и на повреждение компонентов нейроглиальных ансамблей при церебральной гипоперфузии.

5. При разработке лечебных и реабилитационных мероприятий необходимо учитывать, что часть механизмов, обуславливающих высокий уровень стрессоустойчивости и когнитивных способностей, носит взаимоисключающий характер, что требует дальнейшего изучения. Вероятно, этот факт, может быть причиной недостаточной эффективности сложившихся лечебно-реабилитационных схем, не учитывающих типологические особенности высшей нервной деятельности пациента. Как показано, низкий уровень стрессоустойчивости, является фактором риска развития осложнений при нейроциркуляторной патологии. В перспективе, результаты фундаментальных исследований могут лечь не только в основу физиологически обоснованной компенсации низкого уровня стрессоустойчивости, но и будут способствовать повышению эффективности терапевтических мероприятий.

Библиографический список

1. Иванова Н.Е., Иванова Г.Е., Кирьянова В.В., Семенова Ж.Б., Исанова В.А., Русякова И.А., Жарова Е.Н., Соколова Ф.М. Клинические рекомендации нейрореабилитации в нейрохирургии. Санкт-Петербург. 2014. С. 51.
2. Коробов М.В. Реабилитационный потенциал: вопросы теории и применения в практике МСЭ и реабилитации инвалидов.

- Врачебно-трудовая экспертиза. Социально-трудовая реабилитация инвалидов. М: ЦБНТИ. 1995. Вып.17. 22 с.
3. Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Экспериментальные модели когнитивных нарушений. Международный вестник ветеринарии. 2016. № 1. С. 105–116.
 4. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу. Вестн. нов. мед. технол. 2002. Т. 9. № 1. С. 16–18.
 5. Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. М.: Горизонт, 1998.
 6. Коплик Е.В. Роль структур миндалевидного комплекса мозга в гормональных механизмах резистентности крыс к эмоциональному стрессу. Академический журнал Западной Сибири. 2015. Т. 11. № 2 (57). С. 141.
 7. Коплик Е.В., Бахмет А.А., Клочкова С.В. Роль медиальных структур миндалевидного комплекса мозга в пептидергических механизмах устойчивости к эмоциональному стрессу. Научный форум. 2018. Т. 4. № 1. С. 69–72.
 8. Горбунова А.В. Биогенные амины ретикулярной формации среднего мозга и устойчивость к эмоциональному стрессу. Нейрохимия. 2005. Т. 22. № 2. С. 107–114.
 9. Иванникова Н.О., Коплик Е.В. Об особенностях эффективности ноотропа – церебролизина у животных с разной чувствительностью к эмоциональному стрессу. Академический журнал Западной Сибири. 2013. Т. 9. № 3 (46). С. 98–99.
 10. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов. М.: Медицина, 2002.
 11. Зарубина И.В. Молекулярные механизмы индивидуальной устойчивости к гипоксии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2005. Т. 4. № 1. С. 49–51.
 12. Слынько Т.Н., Заречнова Н.Н. Морфофункциональные изменения эндокринных органов при действии алкоголя в ранние сроки адаптации к высокогорью. Вестник КРСУ. 2016. Т. 16. № 3. С. 168–171.
 13. Xiong X., Liang Q., Chen J., Fan R., Cheng T. Proteomics profiling of pituitary, adrenal gland, and splenic lymphocytes in rats with middle cerebral artery occlusion. Biosci Biotechnol Biochem. 2009. Т. 23. Vol. 73 (3). P. 657–64.
 14. Чубукова Т.Н., Угольник Т.С. Изменения показателей гормонов стресса и липидного спектра сыворотки крови крыс при острой церебральной ишемии. Проблемы здоровья и экологии. 2015. № 3 (45). С. 102–107.
 15. Harris T.A., Healy G.N., Colditz P.B. Associations between serum cortisol, cardiovascular function and neurological outcome following acute global hypoxia in the newborn piglet. Stress. 2009. Vol. 12. N4. P. 294–304.
 16. Antonawich F.J., Miller G., Rigsby D.C., Davis J.N. Regulation of ischemic cell death by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone. Neuroscience. 1999. 88 (1). P. 319–25.
 17. Mead G.E. No evidence that severity of stroke in internal carotid occlusion is related to collateral arteries. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2006. Vol. 77. P. 729–733.
 18. Obrenovitch T.P. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. Physiol. Rev. 2008. Vol. 88. № 1. P. 211–247.
 19. Иванникова Н.О., Коплик Е.В., Попова Э.Н., Судаков К.В. Эмоциональный стресс в развитии экспериментального геморрагического инсульта у крыс с различной стресс-устойчивостью. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 10. № 2. С. 39.
 20. Коплик Е.В. Особенности перекисного окисления липидов в коре головного мозга при экспериментальном геморрагическом инсульте у крыс с различной поведенческой активностью. Академический журнал Западной Сибири. 2015. Т. 11. № 1 (56). С. 69.
 21. Коплик Е.В., Перцов С.С. Морфологические изменения ткани мозга у крыс с различной поведенческой активностью при экспериментальном геморрагическом инсульте. Академический журнал Западной Сибири. 2014. Т. 10. № 2 (51). С. 118.
 22. Ключева Л.А. Клеточный состав лимфоидных узелков стенки трахеи крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу в условиях моделирования геморрагического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. 117 (8). С. 63–70. doi:10.17116/jnevro20171178263-70
 23. Коплик Е.В., Классина С.Я. Параметры ээг в динамике восстановления после постстрессорного инсульта у крыс с разными поведенческими характеристиками. Академический журнал Западной Сибири. 2016. Т. 12. № 1 (62). С. 107.
 24. Криштон В.В., Румянцева Т.А., Пожилов Д.А. Морфология GFAP-позитивных клеток коры больших полушарий самцов и самок крыс при развитии церебральной гипоксии в зависимости от уровня стрессоустойчивости. Вестник Российского университета дружбы народов. Медицина. 2019. Т. 23. № 4. С. 397–404. doi: 10.22363/2313-0245-2019-23-4-397-404
 25. Solin A.V., Lyashev Y.D. Stress-induced changes in the liver of rats with different resistance to stress. Bull Exp Biol Med. 2014. 157 (5). P. 571–573. doi:10.1007/s10517-014-2617-7
 26. Serikov V.S., Lyashev Y.D. Effects of Melatonin on Stress-Induced Changes in the Liver of Rats with Different Resistance to Stress. Bull Exp Biol Med. 2015. 159 (3). P. 314–317. doi:10.1007/s10517-015-2950-5
 27. Антипенко Е.А., Густов А.В. Индивидуальная стрессоустойчивость и прогноз заболевания при хронической ишемии головного мозга. Медицинский альманах. 2014. № 3 (33). С. 36–38.
 28. Антипенко Е.А., Дерюгина А.В., Густов А.В. Влияние неспецифической цитопротективной терапии на стрессоустойчивость и компенсаторные возможности пациентов с хронической ишемией головного мозга. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 12. С. 74–78.
 29. Григорьев Н.Р., Баталова Т.А., Чербицова Г.Е. Методические и методологические принципы исследования когнитивных способностей крыс. Успехи физиологических наук. 2019. Т. 50. № 2. С. 93–104.
 30. Duggan M.R., Joshi S., Tan Y.F., et al. Transcriptomic changes in the prefrontal cortex of rats as a function of age and cognitive engagement. Neurobiol Learn Mem. 2019. 163:107035. doi:10.1016/j.nlm.2019.107035
 31. Palmer L.M. Dendritic integration in pyramidal neurons during network activity and disease. Brain Res Bull. 2014. 103. P. 2–10. doi:10.1016/j.brainresbull.2013.09.010.
 32. Srinivas K.V., Buss E.W., Sun Q., et al. The Dendrites of CA2 and CA1 Pyramidal Neurons Differentially Regulate Information Flow in the Cortico-Hippocampal Circuit. J Neurosci. 2017. 37 (12). P. 3276–3293. doi:10.1523/JNEUROSCI.2219-16.2017
 33. Beaulieu-Laroche L., Toloza E.H.S., van der Goes M.S., et al. Enhanced Dendritic Compartmentalization in Human Cortical Neurons. Cell. 2018. 175 (3). P. 643–651.e14. doi:10.1016/j.cell.2018.08.045
 34. Костенко Е.В. Нейропластичность – основа современной концепции нейрореабилитации. Медицинский альфа. Неврология и психиатрия. 2016. Т. 2. № 14. С. 5–11.
 35. Jankowska E., Edgley S.A. How can corticospinal tract neurons contribute to ipsilateral movements? A question with implications for recovery of motor functions. Neuroscientist. 2006. 12. P. 67–79.

36. Santello M., Toni N., Volterra A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. // *Nat Neurosci*. 2019. 22 (2). P. 154–166. doi:10.1038/s41593-018-0325-8.
37. Wallach G., Lallouette J., Herzog N., et al. Glutamate mediated astrocytic filtering of neuronal activity. *PLoS Comput Biol*. 2014. 10 (12). P. 1003964. doi:10.1371/journal.pcbi.1003964
38. Poskanzer K.E., Yuste R. Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016. 113. P. 2675–2684.
39. Brockett A.T., Kane G.A., Monari P.K., et al. Evidence supporting a role for astrocytes in the regulation of cognitive flexibility and neuronal oscillations through the Ca²⁺ binding protein S100 β . *PLoS One*. 2018. 13 (4). P. 0195726. doi:10.1371/journal.pone.0195726.
40. Sardinha V.M., Guerra-Gomes S., Caetano I., Tavares G., Martins M., Reis J.S., Correia J.S., Teixeira-Castro A., Pinto L., Sousa N., Oliveira J.F. Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia*. 2017. 65 (12). P. 1944–1960. doi: 10.1002/glia.23205.
41. Santello M., Toni N., Volterra A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci*. 2019. 22 (2). P. 154–166. doi:10.1038/s41593-018-0325-8
42. Condamine S., Verdier D., Kolta A. Analyzing the Size, Shape, and Directionality of Networks of Coupled Astrocytes. *J Vis Exp*. 2018. (140). P. 58116. doi:10.3791/58116
43. Haim B.L., Rowitch D.H. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*. 2017. 18 (1). P. 31–41. doi:10.1038/nrn.2016.159.
44. Криштон В.В., Румянцева Т.А., Пожилов Д.А. Экспрессия GFAP в коре больших полушарий при развитии церебральной гипоксии у крыс с различными результатами в лабиринте Морриса. *Биомедицина*. 2020. 16 (1). С. 89–98. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-89-98>
45. Криштон В.В., Никонорова В.Г., Румянцева Т.А. Изменения клеточного состава коры головного мозга у крыс с разным уровнем когнитивных функций при церебральной гипоперфузии. // *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2019. 8 (4). С. 22–29. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-4-22-29.
46. Саулина Е.Б. Особенности полового диморфизма когнитивных способностей и структуры интересов подростков с высоким уровнем интеллекта. *Психологическая наука и образование*. 2015. Т 7. № 1. С. 111–121. ISSN: 2074-5885
47. Авдей Г.М. Гендерные особенности когнитивных нарушений у больных с заболеванием крови. *Материалы ежегодной итоговой науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы медицины»*; Январь 22, 2013; Гродно, Режим доступа: <http://elib.grsmu.by/handle/files/15882>.
48. Ордян Н.Э. Гормональные механизмы фенотипической модификации стрессорной реактивности в онтогенезе крыс: автор. дисс. док. биолог. наук. Санкт-Петербург. 2003. 48 стр.
49. Gross H. *Sanctioning Pregnancy: A Psychological Perspective on the Paradoxes and culture of research*. New York: Routledge. 2007. P. 177.
50. Волков А.О., Потапов В.А., Клигуненко Е.Н., Мамчур А.Й., Ветошка И.А. Связь когнитивных нарушений с физиологическими изменениями во время беременности. *Медико-соціальні проблеми сім'ї*. 2014. Т. 19. № 2. С. 19–25.
51. Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psycho-neuroendocrinology*. 2003. V. 28. N. 2. P. 139–168.
52. Сашков В.А., Сельверова Н.Б., Ермакова И.В. Возрастные и половые особенности поведения и уровня стероидных гормонов в мозге у крыс в неонатальном и раннем постнатальном периоде развития. *Новые исследования*. 2008. Т. 1. № 14–1. С. 52–61.
53. Голубродо В.А. Исследование когнитивных способностей лабораторных мышей с использованием генетических моделей: автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 2014. 24 стр.
54. Hadar R., Edemann-Calleen H., Hlusicka E.B., et al. Recurrent stress across life may improve cognitive performance in individual rats, suggesting the induction of resilience. *Transl Psychiatry*. 2019. 9 (1). P. 185. doi:10.1038/s41398-019-0523-5.

References

- Ivanova NE, Ivanova GE, Kiryanova VV, Semenova ZhB, Isanova VA, Ruslyakova IA, Zharova EN, Sokolova FM. *Clinical guidelines for neurorehabilitation in neurosurgery*. St. Petersburg. 2014, 51. (in Russ.).
- Korobov MV. Rehabilitation potential: questions of theory and application in practice of medical and social expertise and rehabilitation of disabled people. *Medical labor expertise. Social and labor rehabilitation of disabled people*. Moscow: 1995;17:22. (in Russ.).
- Shekunova EV, Kashkin VA, Makarova MN, Makarov VG. Experimental models of cognitive impairment. *International Veterinary Bulletin*. 2016;1:105–116. (in Russ.).
- Koplik EV. Method for determining the criterion of rat resistance to emotional stress. *Vestn. new honey. technol*. 2002;9(1):16–18. (in Russ.).
- Sudakov K.V. *Individual resistance to emotional stress*. Moscow: Horizon;1998. (in Russ.).
- Koplik EV. The role of the structures of the amygdala in the hormonal mechanisms of the resistance of rats to emotional stress. *Academic journal of Western Siberia*. 2015;11.2:(57):141. (in Russ.).
- Koplik EV., Bakhmet AA., Klochkova SV. The role of medial structures of the amygdala in the peptidergic mechanisms of resistance to emotional stress. *Scientific Forum*. 2018.4(1):69–72. (in Russ.).
- Gorbunova AV. Biogenic amines of the midbrain reticular formation and resistance to emotional stress. *Neurochemistry*. 2005.22(2):107–114. (in Russ.).
- Ivannikova NO, Koplik EV. On the features of the effectiveness of nootropic – cerebrolysin in animals with different sensitivity to emotional stress. *Academic journal of Western Siberia*. 2013.9.3(46):98–99. (in Russ.)
- Kryzhanovsky GN. *Dysregulatory Pathology: A Guide for Physicians and Biologists*. Moscow: Medicine; 2002. (in Rus).
- Zarubina IV. Molecular mechanisms of individual resistance to hypoxia. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*. 2005. 4(1):49–51. (in Russ.).
- Slynko TN, Zarechnova NN. Morphofunctional changes in endocrine organs under the influence of alcohol in the early stages of adaptation to high mountains. *KRSU Bulletin*. 2016. 16(3):168–171. (in Russ.).
- Xiong X, Liang Q, Chen J, Fan R, Cheng T. Proteomics profiling of pituitary, adrenal gland, and splenic lymphocytes in rats with middle cerebral artery occlusion. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 23. 73 (3):657–64.
- Chubukova TN, Ugolnik TS. Changes in the parameters of stress hormones and the lipid spectrum of the blood serum of rats in acute cerebral ischemia. *Health and ecology problems*. 2015; 3 (45):102–107. (in Russ.).
- Harris TA, Healy GN, Colditz PB. Associations between serum cortisol, cardiovascular function and neurological outcome following acute global hypoxia in the newborn piglet. *Stress*. 2009; 12 (4):294–304.
- Antonawich FJ., Miller G, Rigsby DC, Davis JN. Regulation of ischemic cell death by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone. *Neuroscience*. 1999; 88 (1):319–25.

17. Mead GE. No evidence that severity of stroke in internal carotid occlusion is related to collateral arteries. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2006; 77:729–733.
18. Obrenovitch TP. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol. Rev.* 2008; 88 (1):211–247.
19. Ivannikova NO, Koplik EV, Popova EN, Sudakov K.V. Emotional stress in the development of experimental hemorrhagic stroke in rats with different stress resistance. *Journal of Neurology and Psychiatry. C.C. Korsakov*. 2009; 10.2:39. (in Russ.).
20. Koplik EV. Features of lipid peroxidation in the cerebral cortex during experimental hemorrhagic stroke in rats with different behavioral activity. *Academic journal of Western Siberia*. 2015; 11. 1 (56):69. (in Russ.).
21. Koplik EV, Pertsov SS. Morphological changes in brain tissue in rats with different behavioral activity during experimental hemorrhagic stroke. *Academic journal of Western Siberia*. 2014; 10. 2 (51): 18. (in Russ.).
22. Klyueva LA. Cell composition of lymphoid nodules in the tracheal wall of rats with different resistance to emotional stress under conditions of hemorrhagic stroke simulation. *Journal of Neurology and Psychiatry. S.S. Korsakov*. 2017; 117 (8):63–70. (in Rus). doi:10.17116/jnevro20171178263–70
23. Koplik EV., Klassina SYa. ECG parameters in the dynamics of recovery after post-stress stroke in rats with different behavioral characteristics. *Academic journal of Western Siberia*. 2016; 12. 1 (62):107. (in Russ.).
24. Krishtop VV., Rumyantseva TA., Pozhilov DA. Morphology of GFAP-positive cells of the cerebral hemispheres of male and female rats during the development of cerebral hypoxia, depending on the level of stress resistance. *Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Medicine*. 2019; 23 (4): 397–404. (in Russ.). doi: 10.22363/2313–0245–2019–23–4–397–404
25. Solin AV, Lyashev YD. Stress-induced changes in the liver of rats with different resistance to stress. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 157 (5):571–573. doi:10.1007/s10517–014–2617–7
26. Serikov VS, Lyashev YD. Effects of Melatonin on Stress-Induced Changes in the Liver of Rats with Different Resistance to Stress. *Bull Exp Biol Med*. 2015; 159 (3):314–317. doi:10.1007/s10517–015–2950–5
27. Antipenko EA., Gustov AV. Individual stress resistance and disease prognosis in chronic cerebral ischemia. *Medical almanac*. 2014. 3 (33):36–38. (in Russ.).
28. Antipenko EA., Deryugina AV., Gustov AV. Influence of non-specific cytoprotective therapy on stress resistance and compensatory capabilities of patients with chronic cerebral ischemia. *Journal of Neurology and Psychiatry. C.C. Korsakov*. 2015; 115(12):74–78. (in Russ.).
29. Grigoriev NR, Batalova TA, Cherbikova GE. Methodological and methodological principles of the study of the cognitive abilities of rats. *Advances in physiological sciences*. 2019; 50(2):93–104. (in Russ.).
30. Duggan MR, Joshi S, Tan YF, et al. Transcriptomic changes in the prefrontal cortex of rats as a function of age and cognitive engagement. *Neurobiol Learn Mem*. 2019; 163:107035. doi:10.1016/j.nlm.2019.107035
31. Palmer L.M. Dendritic integration in pyramidal neurons during network activity and disease. *Brain Res Bull*. 2014; 103:2–10. doi:10.1016/j.brainresbull.2013.09.010
32. Srinivas KV, Buss EW, Sun Q, et al. The Dendrites of CA2 and CA1 Pyramidal Neurons Differentially Regulate Information Flow in the Cortico-Hippocampal Circuit. *J Neurosci*. 2017; 37 (12):3276–3293. doi:10.1523/JNEUROSCI.2219–16.2017
33. Beaulieu-Laroche L, Toloza EHS., van der Goes MS, et al. Enhanced Dendritic Compartmentalization in Human Cortical Neurons. *Cell*. 2018; 175 (3):643–651. doi:10.1016/j.cell.2018.08.045
34. Kostenko EV. Neuroplasticity is the basis of the modern concept of neurorehabilitation. *Medical alphabet. Neurology and Psychiatry*. 2016; 2 (14):5–11. (in Russ.).
35. Jankowska E, Edgley SA. How can corticospinal tract neurons contribute to ipsilateral movements? A question with implications for recovery of motor functions. *Neuroscientist*. 2006; 12:67–79.
36. Santello M, Toni N, Volterra A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci*. 2019; 22 (2):154–166. doi:10.1038/s41593–018–0325–8
37. Wallach G, Lallouette J, Herzog N, et al. Glutamate mediated astrocytic filtering of neuronal activity. *PLoS Comput Biol*. 2014; 10 (12):1003964. doi:10.1371/journal.pcbi.1003964
38. Poskanzer KE, Yuste R. Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016; 113:2675–2684.
39. Brockett AT., Kane GA., Monari PK., et al. Evidence supporting a role for astrocytes in the regulation of cognitive flexibility and neuronal oscillations through the Ca²⁺ binding protein S100 β . *PLoS One*. 2018; 13 (4):0195726. doi:10.1371/journal.pone.0195726
40. Sardinha VM., Guerra-Gomes S, Caetano I, Tavares G, Martins M, Reis JS, Correia JS, Teixeira-Castro A, Pinto L, Sousa N, Oliveira JF. Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia*. 2017; 65 (12):1944–1960. doi: 10.1002/glia.23205
41. Santello M, Toni N, Volterra A Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci*. 2019; 22 (2):154–166. doi:10.1038/s41593–018–0325–8
42. Condamine S, Verdier D, Kolta A. Analyzing the Size, Shape, and Directionality of Networks of Coupled Astrocytes. *J Vis Exp*. 2018. (140):58116. doi:10.3791/58116
43. Haim BL, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18 (1):31–41. doi:10.1038/nrn.2016.159
44. Krishtop VV, Rumyantseva TA, Pozhilov DA. Expression of GFAP in the cerebral cortex during the development of cerebral hypoxia in rats with different results in the Morris maze. *Biomedicine*. 2020; 16 (1):89–98. (in Russ). <https://doi.org/10.33647/2074–5982–16–1–89–98>
45. Krishtop VV., Nikonorova VG., Rumyantseva TA. Changes in the cellular composition of the cerebral cortex in rats with different levels of cognitive functions during cerebral hypoperfusion. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2019; 8 (4):22–29. (in Russ). doi: 10.18499 / 2225–7357–2019–8–4–22–29
46. Saulina EB. Features of sexual dimorphism of cognitive abilities and structure of interests of adolescents with a high level of intelligence. *Psychological science and education*. 2015; 7(1):111–121. (in Russ). ISSN: 2074–5885
47. Avdey GM Gender characteristics of cognitive impairment in patients with blood disease. Materials of the annual final scientific-practical. conf. *Actual problems of medicine*. January 22, 2013; Grodno. Available from: <http://elib.grsmu.by/handle/files/15882> (in Russ).
48. Ordyan NE. Hormonal mechanisms of phenotypic modification of stress reactivity in rat ontogenesis: author. diss. doc. biologist. sciences. St. Petersburg; 2003. Available from: https://new-dissert.ru/_avtoreferats/01003296179.pdf. (in Russ.).
49. Gross H. *Sanctioning Pregnancy: A Psychological Perspective on the Paradoxes and culture of research*. New York: Routledge. 2007; 177.
50. Volkov AO., Potapov VA., Kligunenko EN., Mamchur AY., Vetoshka IA. Relationship between cognitive impairment and physiological changes during pregnancy. *Medical and social problems of the family*. 2014; 19 (2):19–25. (in Russ.).

51. Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuro-psychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28 (2):139–168. (in Russ.).
52. Sashkov VA, Selverova NB, Ermakova IV. Age and sex characteristics of behavior and the level of steroid hormones in the brain of rats in the neonatal and early postnatal period of development. *New research*. 2008. 1. (14–1):52–61. (in Russ.).
53. Golibrodo VA. Research of the cognitive abilities of laboratory mice using genetic models: author. dis. cand. biol. sciences Moscow; 2014. Available from: https://new-disser.ru/_avtoreferats/01007884823.pdf (in Russ.).
54. Hadar R, Edemann-Callesen H, Hlusicka EB, et al. Recurrent stress across life may improve cognitive performance in individual rats, suggesting the induction of resilience. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):185. doi:10.1038/s41398-019-0523-5

Ответственный за переписку: Никонорова Варвара Геннадьевна – младший научный сотрудник межкафедральной лаборатории ФГБ ОУ ВО Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени Д.К. Беляева. 153012, Россия, г. Иваново, ул. Советская, д 45. E-mail: bnikon@gmail.com

Криштоп В.В. SPIN-код 3734–5479; ORCID0000–0002–9267–5800

Румянцева Т.А. SPIN-код 7086–0780; ORCID0000–0002–8035–4065

Никонорова В.Г. SPIN-код 2161–4838; ORCID0000–0001–9453–4262

Corresponding author: Nikonorova Varvara Gennadievna – junior researcher of the D.K. Belyaev State Agricultural Academy, 153012, Russia, Ivanovo, Sovetskaya str., 45. E-mail: bnikon@gmail.com

V.V. Chrishtop ORCID0000–0002–9267–5800

T.A. Rumyantseva ORCID0000–0002–8035–4065

V.G. Nikonorova ORCID0000–0001–9453–4262

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
CLINICAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-354-367

Эффективность иммунопатогенетически обоснованной программы системной и локальной интерферонотерапии у иммунокомпromетированных детей раннего возраста

И.В. Нестерова^{1,2}, С.В. Ковалева², Е.О. Халтурина³, Г.А. Чудилова²

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

² Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* В последние годы наблюдается неуклонный рост заболеваемости детей, в структуре которой инфекционная патология занимает лидирующую позицию. Развитие «минимального персистирующего воспаления» слизистой оболочки верхних дыхательных путей является основой для персистирования микрофлоры, входными воротами для аллергенов и ирритантов, создает условия для хронизации воспалительного процесса. *Цель исследования:* на базе изучения особенностей функционирования иммунной системы и системы интерферонов у иммунокомпromетированных детей раннего возраста, страдающих коинфекциями: возвратными ОРВИ, ассоциированными с атипичными хроническими герпес-вирусными инфекциями, разработать новую программу локальной и системной интерферонотерапии и оценить ее эффективность. *Материалы и методы:* под нашим наблюдением находилось 30 детей в возрасте 1–4 лет, 16 мальчиков и 14 девочек, страдающих возвратными ОРВИ, ассоциированными с различными атипичными хроническими активными герпес-вирусными инфекциями (АХА-ГВИ) (ВПГ I/II, ВЭБ, ЦМВ, ВЧГ VI тип) и хроническими рецидивирующими бактериальными инфекциями (группа исследования). Группа сравнения составила 20 условно здоровых детей, сопоставимых по полу и возрасту. Нами были использованы клинико-иммунологические методы: ELISA, ПЦР, цитофлюориметрия. *Результаты.* Клинико-anamнестическое исследование показало, что у детей раннего возраста имелись клинические признаки иммунокомпromетированности: высокая частота возвратных ОРВИ – 10–15 и более эпизодов в год, а продолжительность этих эпизодов составила от 7 до 12 дней, при этом в 100 % случаев имели место рецидивирующие моно- и/или микст АХА-ГВИ. Исследование состояния иммунной системы и системы интерферонов показало, что у детей исследуемой группы наблюдался дефицит Т цитотоксических лимфоцитов, естественных киллерных клеток, сывороточного ИФН α , сывороточного IgA и различные нарушения нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Разработана новая иммунопатогенетически обоснованная программа локальной и системной терапии рекомбинантным ИФН α 2b в сочетании с антиоксидантами, продемонстрировавшая высокую клинико-иммунологическую эффективность, заключающуюся в значительном уменьшении количества эпизодов ОРВИ, уменьшении длительности

© Нестерова И.В., Ковалева С.В., Халтурина Е.О., Чудилова Г.А., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

течения ОРВИ, а также количества осложненных ОРВИ, снижении репликативной активности герпес-вирусов на фоне восстановления системы интерферонов, значительного улучшения противовирусной и противобактериальной иммунной защиты у иммунокомпрометированных детей раннего возраста. **Выводы:** создана новая, иммунопатогенетически обоснованная программа системной и локальной ИФН терапии для иммунокомпрометированных детей раннего возраста. Продемонстрирована высокая клинико-иммунологическая эффективность и иммунопрофилактическая направленность разработанной программы локальной и системной интерферонотерапии.

Ключевые слова: иммунокомпрометированный, дети, интерферонотерапия, вирусные коинфекции, герпес-вирусы

Вклад авторов. Нестерова И.В. – разработка концепции, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; Ковалева С.В. – разработка методологии, проведение исследования; Халтурина Е.О. – ресурсное обеспечение исследования, подготовка текста; Чудилова Г.А. – проведение исследования, проведение статистического анализа.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Нестерова И.В., Ковалева С.В., Халтурина Е.О., Чудилова Г.А. Эффективность иммунопатогенетически обоснованной программы системной и локальной интерферонотерапии у иммунокомпрометированных детей раннего возраста // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. №. 4 С. 354–367. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-354–367

Immunopathogenetically reasonable program effectiveness of systemic and local interferonotherapy in immunocompromised young children

I.V. Nesterova^{1,2}, Kovaleva S.V.², E.O. Khalturina,³ G.A. Chudilova²

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

² Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Annotation. Relevance. In recent years, there has been a steady increase in the incidence of children morbidity, in the structure of which infectious pathology occupies a leading position. The development of «minimal persistent inflammation» of the upper respiratory tract mucosa is the basis for the persistence of microflora, the entrance gate for allergens and irritants, and creates conditions for the timing of the inflammation. *The aim of the study:* based on the study of the features of the immune system and interferon system in immunocompromised children of early age suffering from co-infections: return ARVI associated with atypical chronic herpes virus infections, to develop a new program of local and systemic interferon therapy and evaluate its effectiveness. *Materials and methods:* We observed 30 children aged 1–4 years, 16 boys and 14 girls suffering from recurrent ARVI associated with various atypical chronic active herpes virus infections (ACHA-HVI) (HSV I/II, EBV, CMV, HHV VI). The comparison group was 20 conditionally healthy children, comparable by sex and age. We used clinical and immunological methods: ELISA, PCR, cytofluorimetry. *Results:* A clinical and anamnestic investigation showed that young children had clinical features of immunocomprometization: a high rate of recurrent ARVI of 10–15 or more episodes per year, and the duration of these episodes ranged from 7 to 12 days, while in 100% of cases there were recurrent mono- and/or mixed ACHA-HVI. A study of the state of the immune system and the interferon system showed that children of the study group were deficient in T cytotoxic lymphocytes, natural killer cells, serum IFN α , serum IgA, and various disorders of neutrophil granulocytes (NG).

A new immunopathogenetically based program of local and systemic therapy with recombinant IFN α 2b in combination with antioxidants has been developed. This program demonstrated a high clinical-immunological effectiveness, providing in a significant reduction of ARVI episode rates, a reduction in the duration of IRVI, as well as the number of complicated ARVI, a decrease in the replicative activity of herpes viruses in a field of restoration of the interferon system, a significant improvement of antiviral and antibacterial immune response. *Conclusions:* A new immunopathogenetically based program of systemic and local IFN- therapy for immunocompromised young children has been created. The high clinical-immunological effectiveness and immunoprophylactic orientation of the developed local and systemic program of interferonotherapy have been demonstrated.

Key words: immunocompromised, children, interferonotherapy, viral co-infections, herpes viruses

Author contributions. Nesterova I.V.– concept development, text editing, approval of the final version of the article; Kovaleva S.V.– development of methodology, research; Khalturina E.O.– resource support for research, preparation of the text; Chudilova G.A.– conducting statistical analysis, research.

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

Received 28.08. 2020. Accepted 11.09.2020

For citation: Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Khalturina E.O., Chudilova G.A. Immunopathogenetically reasonable program effectiveness of systemic and local interferonotherapy in immunocompromised young children. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):354–367. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-354–367

Введение

Проблема частой заболеваемости респираторными вирусно-бактериальными инфекциями у детей является одной из наиболее острых в современной педиатрии и клинической иммунологии, что обусловлено как медицинскими, так и социально-экономическими аспектами [1, 2]. В условиях неуклонно растущей урбанизации и возникающих микроклиматов мегаполисов наблюдается абсолютный и относительный рост заболеваемости детей в целом [3], в то время как респираторные инфекции вирусной, бактериальной и вирусно-бактериальной этиологии составляют 77% от всех заболеваний [4–7].

В настоящее время выделены и изучены основные медико-социальные аспекты, влияющие на рост числа инфекционно-аллергических заболеваний в детской популяции. Некоторыми из них являются загрязнение окружающей среды, появление новых патогенов и аллергенов, изменение рациона и структуры питания детей, стресс как образ жизни. Экзогенные аэрополлютанты, такие как азот и озон, вызывают повреждение эпителия верхних и нижних дыхательных путей, что приводит к высвобождению медиаторов воспаления (гиалуран, ПАФ, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α), усилению синтеза IgE, по-

вышению проницаемости бронхов, снижению частоты мерцания ресничек эпителия респираторного тракта [1–3]. Все эти факторы приводят к развитию «минимального персистирующего воспаления» (МПВ) в биотопе верхних дыхательных путей, что является основным триггерным фактором назальной и бронхиальной гиперреактивности. Зачастую прогрессирование МПВ приводит к формированию хронических воспалительных процессов во входных воротах инфекции: полости носа, полости рта, глотке, глоточных миндалинах, бронхиальном дереве [8–11]. Все эти факторы приводят к увеличению числа лиц с дефектами основных защитных систем, которые проявляются в виде патологии рецепторов, ферментативной активности и снижении иммунологической реактивности. Было показано, что эти дефекты могут передаваться по наследству, возникать внутриутробно или в постнеонатальном периоде.

Клинически это проявляется в увеличении числа лиц с рецидивирующими и длительно текущими респираторными заболеваниями [12–20]. Дыхательные пути находятся в непосредственном контакте с внешней средой, и при снижении иммунологической реактивности страдают в первую очередь, что проявляется в виде рецидивирующих

ОРВИ и атипичных хронических активных герпес вирусных инфекциях (АХА-ГВИ) [4, 9–11, 21, 22]. Появление рецидивирующих ОРВИ или АХА-ГВИ рассматривается в качестве клинических «индикаторных» критериев наличия дефектов противомикробных механизмов иммунной защиты [23–26]. Высокая микробная антигенная нагрузка с одной стороны вызывает дебют нарушений в иммунной системе, с другой стороны – способствует усугублению дефектов функционирования иммунной системы [13–17, 23, 25]. Эти данные свидетельствуют о том, что существующие методы профилактики, лечения и реабилитации детей являются недостаточными. Для выявления и своевременного проведения комплексной иммунореабилитации детей, страдающих возвратными ОРЗ, необходимо выявить не только группы риска среди ЧДБ детей, уточнив характер негативного воздействия микросоциальных и биологических факторов, но и оценить варианты нарушений функционирования иммунной системы и системы интерферонов. Уточнение уровня нарушений в иммунной системе, системе ИФН и ассоциированных с ними клинических признаков иммунокомпрометированности ребенка должно способствовать созданию адекватных программ иммунореабилитации, органично включающих ИФН- и/или иммунотерапию [12, 16, 17, 20, 24, 26].

Цель исследования: на базе изучения особенностей функционирования иммунной системы и системы интерферонов у иммунокомпрометированных детей раннего возраста, страдающих коинфекциями: возвратными ОРВИ, ассоциированными с атипичными хроническими герпес-вирусными инфекциями, разработать новую программу локальной и системной интерферонотерапии и оценить ее эффективность.

Материалы и методы

Клинико-иммунологическое исследование проведено у 30 детей раннего возраста (1–4 года), 14 девочек и 16 мальчиков, страдающих частыми возвратными ОРВИ и АХА-ГВИ. Были разработаны клинические критерии включения в исследование, учитывающие клинические проявления иммунодефицита с инфекционным синдромом, указывающие

нарушения в работе иммунной системы: частота эпизодов ОРВИ более 10 раз в год, частота осложненных ОРВИ: острая бактериальная инфекция носоглоточной области с последующим присоединением инфекций нижних дыхательных путей с частотой до 2–3 раз в год, а также выявленная резистентность к проводимой традиционной терапии. Кроме того, в 100% случаев эта патология была ассоциирована с АХА-ГВИ (ВПГ I/II, ВЭБ, ЦМВ, ВЧГ VI тип). 20 условно здоровых детей вошли в группу сравнения, при этом пол и возраст детей были сопоставимы.

Нами были использованы следующие иммунологические методы: а) для определения субпопуляций Т-клеток, В-клеток и естественных клеток-киллеров (NK) использовался метод проточной цитометрии (Beckman Coulter International, США); б) при изучении фагоцитарных функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ) оценивались критерии завершенности фагоцитоза, в) изучалась активность кислородзависимых микробицидных систем НГ в спонтанном и стимулированном NBT-тесте; г) для определения уровней сывороточных ИФН α , ИФН γ , IgA, IgM, IgG использовался метод ELISA; д) для обнаружения различных типов герпес-вирусов были применены серологические методы и метод ПЦР.

Исследование было одобрено этическим комитетом Кубанского государственного медицинского университета. У родителей детей было получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинской Декларации ВМА (2000 г.). Адекватная обработка полученных данных проводилась с применением пакета StatSoftStatistica 10.0.

Результаты и обсуждение

Группы исследования включали детей раннего возраста: 30 детей (1–4 года), страдающих возвратными ОРВИ и АХА-ГВИ. Все дети имели инфекционный анамнез ОРВИ давностью от 1 года до 3 лет 3 месяцев, что составило 1,9 (1,32; 2,3) года. Причем у 1/3 детей давность анамнеза повышенной частоты респираторных заболеваний составила более 2 лет. Дети имели высокую частоту возвратных ОРВИ – свыше 10 эпизодов в год

(от 12 до 20 эпизодов в год или до 1–2 эпизодов в месяц) и переносили от 15,0 (12,25; 16,0) ОРВИ различной этиологии в год. Клинически у детей из группы исследования наиболее часто возвратные ОРВИ имели преимущественно неосложненный характер. Продолжительность периода острых клинических признаков ОРВИ в группе детей 1–4 лет составляла от 5 до 10 дней – 7,5 (7,0; 8,0) дней (Рис. 1). Общая продолжительность периодов между рецидивами ОРВИ составила 8,5 (8,17; 8,8) месяцев в течение 1 года. Однако у всех наблюдаемых детей ежегодно имели место 2–3 эпизода осложненных ОРВИ в виде присоединения бактериальных инфекций респираторного тракта и ЛОР-органов. При этом отмечалось увеличение продолжительности заболеваний до 14–21 дней (Рис. 1).

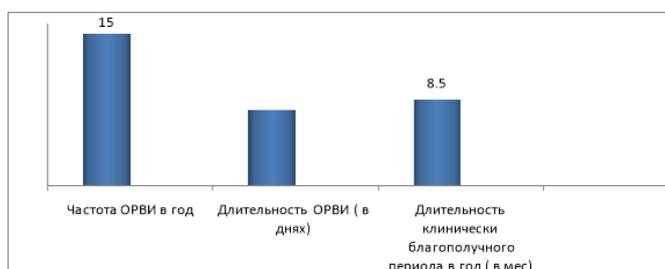


Рис. 1. Клинические критерии, характеризующие снижение противоинфекционного и протективного иммунитета у детей (возраст 1–4 года) с вирусной коинфекцией

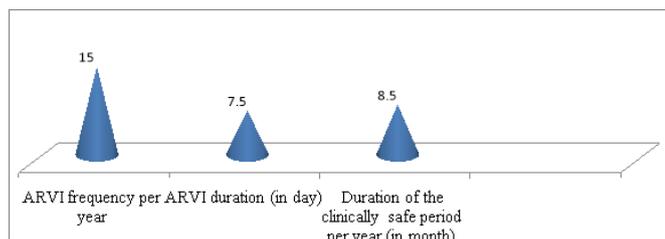


Fig. 1. Clinical criteria characterizing the reduction of anti-infectious and protective immunity in children (1–4 years old) with viral co-infection

У детей с рецидивирующими респираторными инфекциями АХА-ГВИ были обнаружены в 100 % случаев, со следующим распределением по частоте встречаемости: ВЧГ VI типа – 76,7 %, ВЭБ – 66,7 %, ЦМВ – 60 % и ВПГ I/II типа – 16,7 %. Важно отметить, что в большинстве случаев (83,3 %) авторы обнаружили хроническую активную персистирующую микст-ГВИ с различными комбинациями детекции герпес-вирусов. Хроническая персистирующая моно-ГВИ была обнаружена у 16,7 % детей. При этом геном (ДНК) вирусов герпеса был обнаружен в одном или нескольких биологических материалах (соскоб из носоглотки, слюна, моча, кровь и т.д.) даже тогда, когда не было проявлений острых респираторных и герпетических вирусных инфекций. Инфекция ВПГ I/II носила латентный характер, и клинических признаков этой инфекции, а также амплификации ДНК ВПГ I/II в различных биологических материалах и средах обнаружено не было. Этот факт может быть дополнительным критерием иммунокомпрометированности и иметь большое значение для определения тактики лечения.

При изучении состояния иммунной системы у детей раннего возраста с вирусной коинфекцией были обнаружены изменения, связанные с нарушением механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Так, у детей с частыми ОРВИ и АХА-ГВИ выявлено повышение общего количества лейкоцитов ($p < 0,05$). Между тем отмечено снижение числа Т-цитотоксических $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов с киллерной активностью ($p < 0,05$), при этом инверсии ИРИ1 выявлено не было, ИРИ1 составил 1,58 (1,5; 1,8) и не отличался от такового, выявленного у детей группы сравнения ($p > 0,05$). Был установлен неадекватный ответ естественных киллерных клеток (ЕКК) $CD3-CD16^+CD56^+$ на вирусную коинфекцию: относительное и абсолютное количество ЕКК не отличалось от показателей группы сравнения 1 ($p_{1,2} > 0,05$) (Рис. 2). Между тем необходимо подчеркнуть, что при формировании адекватного стереотипного иммунного ответа, необходимого для эффективного киллинга вирусов, должно наблюдаться увеличение количества ЕКК цитотоксических Т-клеток и сывороточных ИФН.

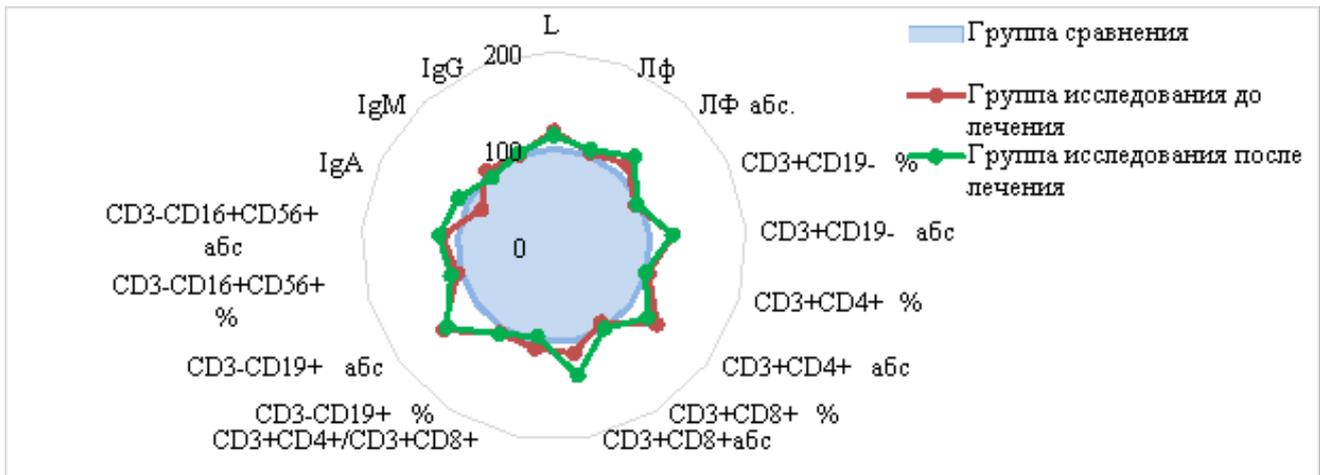


Рис. 2. Изменение клеточного и гуморального иммунитета у детей 1–4 лет с вирусной коинфекцией на фоне локальной и системной интерферонотерапии (процент от контроля)

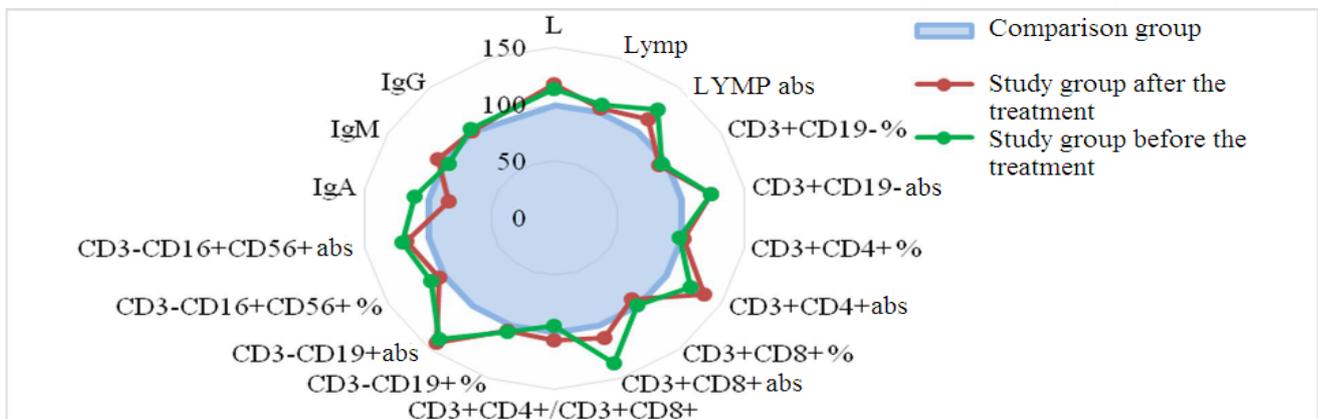


Fig. 2. Change in cellular and humoral immunity in children 1–4 years old with viral co-infection against the background of local and systemic interferonotherapy (percentage of control)

Относительное и абсолютное количество CD3⁺CD19⁺ В-лимфоцитов, уровни сывороточных IgA, IgM, IgG у детей этой возрастной группы не отличались от значений группы сравнения ($p_{1,2,3,4} > 0,05$). Данные особенности свидетельствовали об отсутствии реагирования гуморального звена иммунной системы на вирусную коинфекцию. Выявленные дефекты функционирования гуморальных механизмов адаптивного иммунитета также способствуют снижению как противовирусной, так и антибактериальной защиты, что потенциально увеличивает риск

присоединения вторичной бактериальной инфекции и формирования хронической патологии.

Анализ количества НГ у детей группы исследования с частыми ОРВИ и АХА-ГВИ выявил необходимость разделения детей на две подгруппы. В подгруппе 1a количество НГ не отличалось от показателей условно здоровых детей ($p > 0,05$). У детей в подгруппе 1b был отмечен дефицит НГ ($p < 0,05$), что свидетельствовало о нарушении в системе НГ в виде количественного дефицита – умеренной нейтропении.

При анализе фагоцитарной функции НГ были обнаружены дефекты функционирования системы нейтрофильных фагоцитов у иммунокомпрометированных детей раннего возраста: снижение относительного и абсолютного количества ФАН в подгруппе 1а и подгруппе 1б группы исследования 1 ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$), снижение поглотительной

способности НГ (ФИ, ФЧ). При изучении завершенности фагоцитоза был выявлен неоднозначный характер изменений: у детей подгруппы 1а наблюдался пониженный ИП ($p < 0,01$), в то время как у детей подгруппы 1б, имеющих относительную нейтропению, регистрировалось увеличение % в 1,2 раза (Рис. 3 а, б).

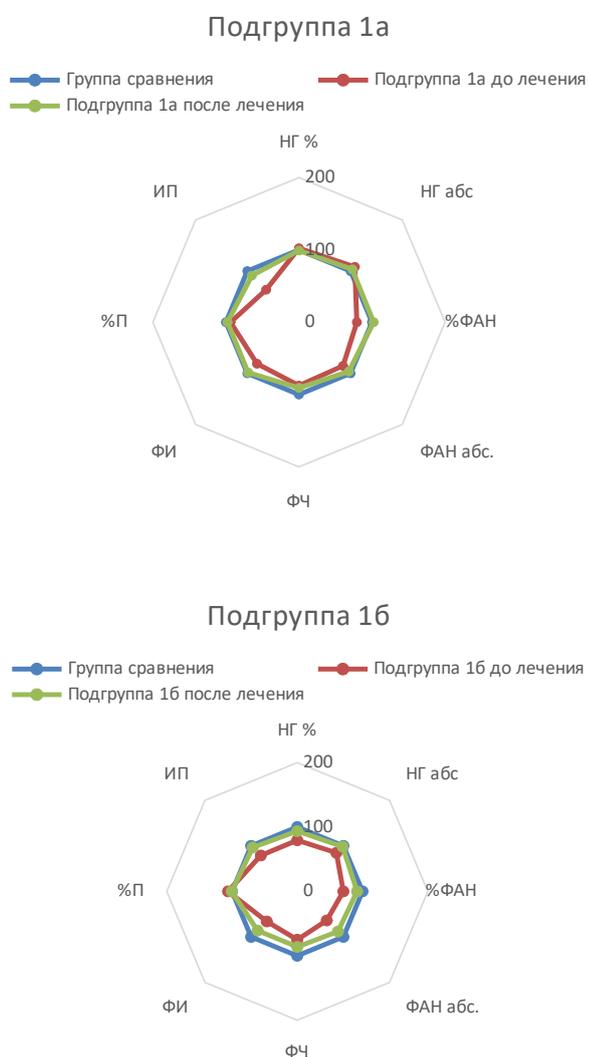


Рис. 3. Показатели фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 1–4 лет с вирусной коинфекцией на фоне локальной и системной интерферонотерапии (процент от контроля)

Fig. 3. Indicators of phagocytic activity of neutrophil granulocytes in children 1–4 years old with viral co-infection against the background of local and systemic interferonotherapy (percentage of control)

Оба варианта дефектного функционирования НГ сопровождаются не только повторными ОРВИ, но и осложняют их течение, обуславливая присоединение бактериальных коинфекций на ранних стадиях развития вирусного процесса.

Оценка состояния системы ИФН у детей группы исследования 1 (1–4) года показала, что возвратные ОРВИ и АХА-ГВИ были ассоциированы со снижением уровня сывороточного ИФН α , который был в 2,7 раза ниже, чем в соответствующей группе сравнения: 3,15 (1,83; 5,91) пг/мл против 8,64 (6,76; 12,14) пг/мл ($p < 0,05$). Уровень сывороточного ИФН γ не отличался от такового в группе сравнения: 1,97 (0,63; 6,22) пг/мл против 1,34 (0,71; 5,94) ($p > 0,05$) (Рис. 4).

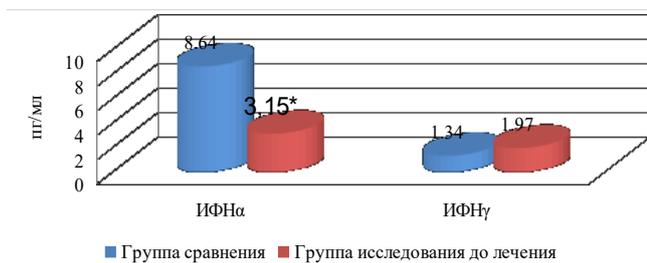


Рис. 4. Показатели системы интерферонов у иммунокомпрометированных детей раннего возраста с вирусной коинфекцией

Примечание: * - статистически значимые различия между показателями группы сравнения и группой исследования, $p < 0,05$.

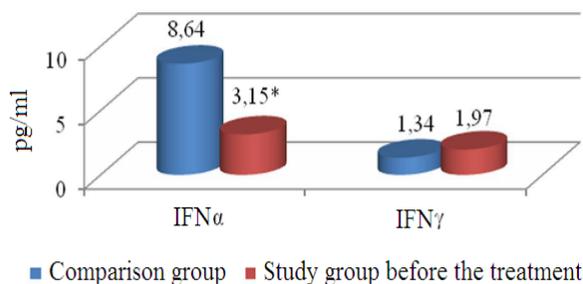


Fig. 4. Indicators of the interferon system in immunocompromised young children with a viral coinfection

Note: * - statistically significant distinctions between indicators of the comparison group and the group being studied, $p < 0,05$.

Таким образом, у детей раннего возраста с вирусной коинфекцией (возвратные ОРВИ и АХА-ГВИ) была выявлена неполноценность ответа иммунной системы на вирусный инфекционный процесс, что выражалось в виде неадекватного реагирования врожденных и адаптивных механизмов противовирусной иммунной защиты (дефицит цитотоксических Т лимфоцитов и ЕКК, дефицит ИФН α , различные дефекты функционирования НГ).

В связи с вышеизложенным нами была разработана новая программа локальной и системной терапии ИФН, которая была органично включена в созданную ранее комплексную программу иммунореабилитации иммунокомпрометированных детей, страдающих частыми рецидивирующими коинфекциями вирусной, бактериальной и бактериально-вирусной этиологии, разработанную Нестеровой И.В. и соавт. (2004) [24].

Созданная комплексная программа реабилитации иммунной системы иммунокомпрометированных детей раннего возраста включала новую тактику применения локальной и системной терапии ИФН: длительную непрерывную локальную и пролонгированную прерывистую системную терапию рекомбинантным интерфероном альфа 2b (гИФН α 2b) в комплексе с антиоксидантами. Локальная терапия ИФН проводилась с использованием геля гИФН α 2b в комплексе с антиоксидантом, который наносили на миндалины, заднюю стенку глотки и слизистую каждого носового хода до 4–6 раз в день непрерывно в течение всего курса терапии. При проведении системной прерывистой терапии ИФН применялись ректальные суппозитории гИФН α 2b в комбинации с антиоксидантами в разовой дозе 150 000 МЕ x 2 раза в день, каждые 12 часов в течение 10 дней (суточная доза гИФН α 2b была равна 300 000 МЕ), далее следовал перерыв 10 дней, который в дальнейшем выдерживался между каждыми курсами системной терапии ИФН. Общее количество курсов системной терапии гИФН α 2b – 5, при этом общая продолжительность локальной и системной терапии гИФН α 2b составила 90 дней.

В результате проведенного лечения были достигнуты следующие положительные клинические эффекты: снижение частоты ОРВИ в 3,8 раз – от 15

(12,25; 16) до 3,9 (0,7; 5,2) эпизодов ОРВИ в год ($p < 0,05$); сокращение их продолжительности в 1,3 раза – с 7,5 (7; 8) дней до 5,6 (4,8; 6,2) дней ($p < 0,05$) (Рис. 5). Клинически ОРВИ стали протекать в более легкой форме с вовлечением в патологический процесс только верхних дыхательных путей: острый ринит, острый фарингит. Кроме того, отмечалось сокращение продолжительности гипертермии на фоне ОРВИ, а также уменьшение выраженности симптомов интоксикации.

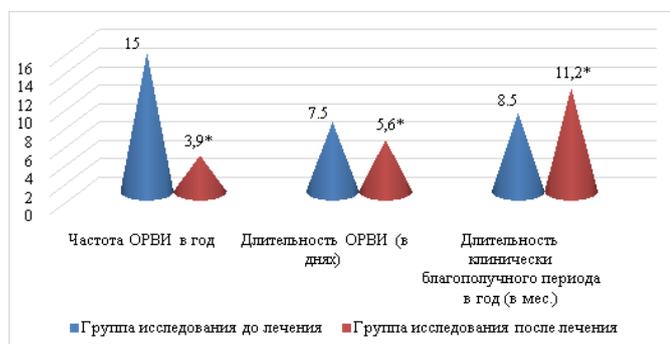


Рис. 5. Клиническая эффективность программной иммунореабилитации с включением оптимизированной локальной и системной интерферонотерапии у иммунокомпрометированных детей с вирусной коинфекцией

Примечание: * - статистически значимые различия между показателями исследуемой группы до и после лечения, $p < 0,05$.

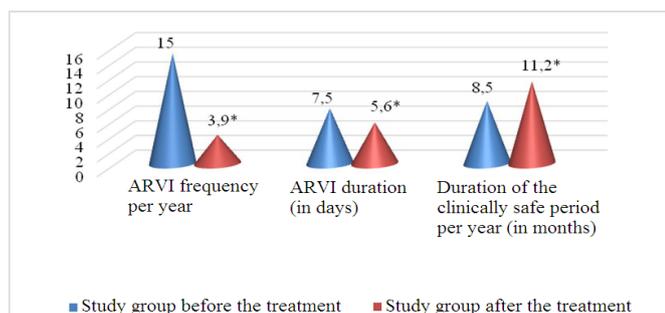


Fig.5. Clinical efficiency of the program immunorehabilitation involving optimized local and systemic interferon therapy in immunocompromised young children with a viral co-infection

Note: * - statistically significant distinctions between indicators of the study group before and after the treatment, $p < 0,05$.

Комплексное лечение, включая местную и системную терапию интерфероном, привело к значительному увеличению безрецидивного периода – периода «свободного от острых инфекционных эпизодов» с 8,5 (8,17; 8,88) месяцев до 11,2 (10,8; 11,4) месяцев в год ($p < 0,05$) (Рис. 5).

После завершения программы локальной и системной интерферонотерапии у детей раннего возраста с вирусной коинфекцией наблюдалось снижение частоты амплификации ДНК вирусов герпеса в 2,3–4,5 раза (ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ VI тип) (Рис. 6).

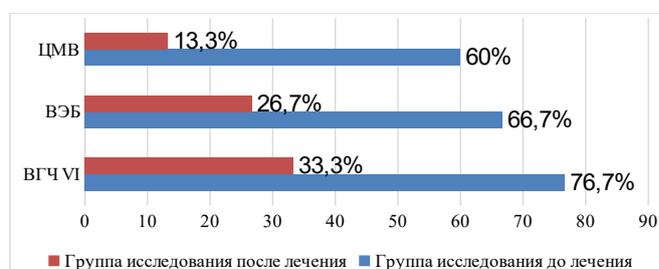


Рис. 6. Частота детекции ДНК герпес-вирусов у иммунокомпрометированных детей с вирусной коинфекцией до и после программной иммунореабилитации

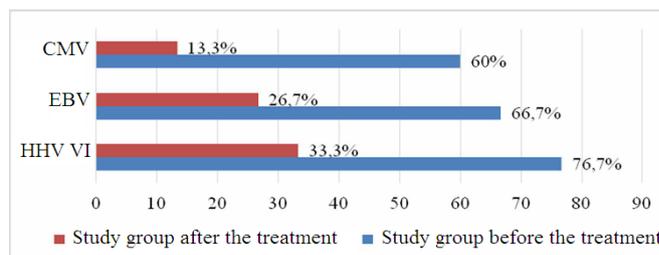


Fig. 6. The frequency of detection of herpes virus DNA in immunocompromised young children with a viral co-infection before and after the program immunorehabilitation

При этом после окончания интерферонотерапии ДНК вирусов герпеса в периферической крови не была обнаружена, однако она детектировалась в слюне или соскобе из носоглотки. В то время как до начала проведения программы реабилитации иммунной системы амплификация генома вируса герпеса была выявлена в основном (у 60% детей) в нескольких биологических материалах (соскоб из носоглотки, слюна, моча, кровь). Полученные данные свидетельствуют о снижении вирусной нагрузки после проведения локальной и системной интерферонотерапии.

Длительная локальная и пролонгированная прерывистая системная терапия гИФН α 2b в комбинации с антиоксидантами привела к статистически значимому повышению уровня сывороточного ИФН α до 9,32 (6,32; 13,49) пг/мл по сравнению с 3,15 (1,83; 5,91) пг/мл до лечения ($p < 0,05$), при этом следует подчеркнуть, что этот уровень достиг значений группы сравнения ($p > 0,05$). Между тем уровень ИФН γ статистически значимо не изменился – 1,58 (0,79; 6,55) пг/мл после проведения терапии гИФН α 2b по сравнению с показателями до терапии 1,97 (0,63; 6,22) пг/мл в группе сравнения 1,34 (0,71; 5,94) пг/мл ($p > 0,05$).

После проведения курса терапии у детей раннего возраста с вирусной коинфекцией относительное и абсолютное количество CD3⁻CD19⁺ В-лимфоцитов не отличалось ни от значения до лечения ($p_{1,2} > 0,05$), ни от показателей группы сравнения

($p_{1,2} > 0,05$). Между тем уровень сывороточного IgA увеличился в 1,3 раза по сравнению с показателями до лечения ($p > 0,05$), но он не отличался от уровня условно здоровых детей ($p > 0,05$). Уровни сывороточного Ig M и Ig G не изменились по сравнению с показателями детей до лечения и группой сравнения статистически значимым образом. Соответственно, выявленное у этой группы детей, страдающих вирусными коинфекциями, состояние функциональной неответственности гуморального звена иммунитета, наблюдаемое перед лечением, было нивелировано. В сыворотке крови определялись уровни Ig M, Ig G и, в частности, Ig A, способствующие адекватной противомикробной защите на фоне снижения частоты повторных неосложненных и осложненных ОРВИ и активности АХА-ГВИ (таблица 1).

Таблица 1

Состояние клеточного и гуморального иммунитета у иммунокомпрометированных детей 1–4 лет с вирусной ко-инфекцией на фоне локальной и системной интерферонотерапии (Me(Q₁; Q₃))

Показатели		Группа сравнения	Группа исследования до лечения	Группа исследования после лечения
L	10 ⁹ /л	5,8(5,39; 5,96)	6,85(5,7;8,3)*	6,6(6,2;7,9)*
Лимфоциты	%	50(43,25; 60,5)	51,50(44,0; 62,0)	53(44,8; 60,3)
	10 ⁹ /л	2,9(2,5;3,21)	3,29(2,9;4,1)	3,6(2,9;4,3)
CD3 ⁺ CD19 ⁻	%	70,5(61,03;72,9)	66,45(59,3; 72,0)	67,9(63,4; 71,6)
	10 ⁹ /л	1,87(1,7;2,13)	2,32(1,9;3,0)	2,31(2,0;2,7)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	41(39,95; 42,73)	41,86(39,7; 46,7)	40,5(38,4; 42,7)
	10 ⁹ /л	1,12(0,94;1,41)	1,50(1,2;1,7)	1,37(1,1;1,4)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	27,9(25,93; 30,6)	25,88(22,8; 26,8)*	27,85(26,1; 30,7)^
	10 ⁹ /л	0,73(0,61; 0,8)	0,82(0,7;1,3)	0,99(0,96;1,2)*^
ИРИ		1,47(1,35; 1,73)	1,58(1,5;1,8)	1,39(1,1;1,7)
CD3 ⁻ CD19 ⁺	%	17,2(14,23; 19,88)	18,20(17,1; 20,2)	18,35(15,6; 22,8)
	10 ⁹ /л	0,46(0,33;0,68)	0,66(0,4;1,0)	0,64(0,6;0,8)
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	10,3(8,98; 15,58)	10,71(6,8; 13,7)	11,45(7,7; 15,8)
	10 ⁹ /л	0,3(0,29; 0,43)	0,35(0,31;0,5)	0,36(0,2;0,8)
IgA	г/л	1,32(1,11; 1,48)	1,11(1,0;1,4)	1,46(1,3;1,6)^
IgM	г/л	1,32(1,21; 1,41)	1,38(1,3;1,5)	1,26(1,0;1,3)
IgG	г/л	12,12(11,01;13,89)	12,15(11,7; 13,6)	12,37(10,8; 13,3)

Примечание: *- статистически значимые различия между показателями группы сравнения и исследуемой группой, $p < 0,05$; ^ – статистически значимые различия между группами до и после лечения, $p < 0,05$.

Table 1

State of cellular and humoral immunity in immunocompromised children of 1–4 years old with viral co-infection in the background of local and systemic interferonotherapy (Me (Q1; Q3))

Indicators		Comparison group	Study group before treatment	Study group after treatment
L	10 ⁹ /L	5,8(5,39; 5,96)	6,85(5,7;8,3)*	6,6(6,2;7,9)*
Lymphocytes	%	50(43,25; 60,5)	51,50(44,0; 62,0)	53(44,8; 60,3)
	10 ⁹ /L	2,9(2,5;3,21)	3,29(2,9;4,1)	3,6(2,9;4,3)
CD3 ⁺ CD19 ⁻	%	70,5(61,03;72,9)	66,45(59,3; 72,0)	67,9(63,4; 71,6)
	10 ⁹ /L	1,87(1,7;2,13)	2,32(1,9;3,0)	2,31(2,0;2,7)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	41(39,95; 42,73)	41,86(39,7; 46,7)	40,5(38,4; 42,7)
	10 ⁹ /L	1,12(0,94;1,41)	1,50(1,2;1,7)	1,37(1,1;1,4)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	27,9(25,93; 30,6)	25,88(22,8; 26,8)*	27,85(26,1; 30,7)^
	10 ⁹ /L	0,73(0,61; 0,8)	0,82(0,7;1,3)	0,99(0,96;1,2)**
IRI		1,47(1,35; 1,73)	1,58(1,5;1,8)	1,39(1,1;1,7)
CD3 ⁻ CD19 ⁺	%	17,2(14,23; 19,88)	18,20(17,1; 20,2)	18,35(15,6; 22,8)
	10 ⁹ /L	0,46(0,33;0,68)	0,66(0,4;1,0)	0,64(0,6;0,8)
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	10,3(8,98; 15,58)	10,71(6,8; 13,7)	11,45(7,7; 15,8)
	10 ⁹ /L	0,3(0,29; 0,43)	0,35(0,31;0,5)	0,36(0,2;0,8)
IgA	g/L	1,32(1,11; 1,48)	1,11(1,0;1,4)	1,46(1,3;1,6)^
IgM	g/L	1,32(1,21; 1,41)	1,38(1,3;1,5)	1,26(1,0;1,3)
IgG	g/L	12,12(11,01;13,89)	12,15(11,7; 13,6)	12,37(10,8; 13,3)

Примечание: * - статистически значимые различия между показателями группы сравнения и исследуемой группой, $p < 0,05$; ^ - статистически значимые различия между группами до и после лечения, $p < 0,05$.

Оценка параметров, характеризующих состояние иммунной системы у детей раннего возраста с вирусной коинфекцией, имеющих клинико-иммунологические признаки иммунокомпрометированности, проведена после завершения комплексной реабилитации иммунной системы, включающей программы локальной и системной пролонгированной интерферонотерапии. Продемонстрированы достоверные изменения, свидетельствующие о восстановлении дефектного функционирования защитных микробицидных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, а также системы ИФН.

Исследование состояния иммунной системы и системы интерферонов показало, что у иммунокомпрометированных детей раннего возраста, страдающих возвратными ОРВИ более 10 раз в год в сочетании с АХА-ГВИ, наблюдался дефицит сывороточного ИФН α , Т цитотоксических лимфоцитов, сывороточного IgA, различные нарушения

нейтрофильных гранулоцитов, неадекватный ответ на инфекцию естественных киллерных клеток. Принимая во внимание имеющиеся клинические и иммунологические критерии, свидетельствующие о значительных нарушениях в иммунной системе и системе ИФН, была разработана новая иммунопатогенетически обоснованная программа локальной и системной терапии рекомбинантным ИФН α 2b в сочетании с антиоксидантами. Состояние иммунной системы и клинико-anamнестические критерии, характеризующие состояние иммунокомпрометированного ребенка, исследовались до и после проведения созданной программы локальной и системной ИФН терапии, включенной в разработанную ранее программу комплексной иммунореабилитации. Созданная программа ИФН терапии, включающая непрерывную локальную терапию гелем гИФН α 2b в комбинации с антиоксидантом (обработка носовых ходов, миндалин, задней стенки глотки и т.д.)

и системную пролонгированную прерывистую терапию – суппозитории гИФН α 2b в комбинации с антиоксидантами, продемонстрировала высокую клинико-иммунологическую эффективность. Клиническая и иммунологическая эффективность новой программы локальной и системной ИФН терапии, созданной для детей, страдающих частыми возвратными ОРВИ в сочетании с АХА-ГВИ, заключалась в значительном уменьшении количества эпизодов ОРВИ, уменьшении длительности течения ОРВИ, а также количества осложненных ОРВИ, снижении репликативной активности герпес-вирусов на фоне восстановления системы интерферонов, значительного улучшения противовирусной и противобактериальной иммунной защиты у иммунокомпromетированных детей раннего возраста.

Выводы

1. Показано, что у иммунокомпromетированных детей раннего возраста, страдающих возвратными ОРВИ в сочетании с АХА-ГВИ, имеется дефицит сывороточного ИФН α , дефицит Т-цитотоксических лимфоцитов, дефицит сывороточного IgA, дефектность функционирования нейтрофильных гранулоцитов, неадекватный ответ на вирусную коинфекцию ЕКК.

2. Создана новая, иммунопатогенетически обоснованная, программа системной и локальной ИФН терапии для иммунокомпromетированных детей раннего возраста, страдающих возвратными ОРВИ в сочетании с АХА-ГВИ.

3. Продемонстрирована высокая клинико-иммунологическая эффективность и иммунопрофилактическая направленность разработанной программы локальной и системной интерферонотерапии.

Библиографический список

1. Дерюшева А.В., Львов И.И., Леготина Н.С. Обоснование программы лечебно-профилактических мероприятий у часто болеющих детей раннего возраста. *Детские инфекции*. 2017. № 1. С. 15–20.
2. Груздева О.В., Улыбка Е.В., Вербианова О.М. Возможности и механизмы компенсаторного развития часто болеющих детей старшего дошкольного возраста. *Вестник Красноярского государственного педагогического университета им. В.П. Астафьева*. 2018. № 3(45). С. 135–145.
3. Ивардава М.И. Место иммуномодуляторов в лечении острой респираторной инфекции у часто болеющих детей. *ВСП*. 2011. № 3. С. 103–107.
4. Бабаченко И.В., Кветная А.С., Мельник О.В., Левина А.С. Патогенез формирования частых респираторных заболеваний у детей с Эпштейна-Барр-вирусной и цитомегаловирусной инфекцией. *Журнал инфектологии*. 2011. Т. 3. № 4. С. 67–72.
5. Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Вирусно-бактериальные коинфекции как глобальная проблема современной медицины. *Вестник РУДН. Серия: Медицина*. 2018. Т. 22 № 1. С. 29–42.
6. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Лобзин Ю.В., Таточенко В.К., Усков А.Н., Вахитов Х.М., Пикуза О.И., Вахитова Л.Ф., Закирова А.М., Ризванова Ф.Ф. Индукторы интерферона в профилактике и лечении респираторных инфекций у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019. Т. 64(3). С. 103–108. DOI: 10.21508/1027–4065–2019–64–3–103–108.
7. Harada, Y., Kinoshita, F., Yoshida L.M., Minh L.N., Suzuki M., Morimoto K., Toku Y., Tomimasu K., Moriuchi H., Ariyoshi K. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J*. 2013. V. 32(5). P. 441–445. DOI: 10.1097/INF.0b013e31828ba08c.
8. Канкасова М.Н., Мохова О.Г., Поздеева О.С. Часто болеющие дети: взгляд инфекциониста. *Практическая медицина*. 2014. Т. 9(85). С. 67–71.
9. Корниченко М.Н., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Феклисова Л.В., Савицкая Н.А. Роль оппортунистических инфекций в этиологии острых респираторных заболеваний с осложненным течением у часто болеющих детей. *Детские инфекции*. 2012. Т. 11. № 3. С. 54–56.
10. Левина А.С., Бабаченко И.В. Персистирующие инфекции у часто и длительно болеющих детей, возможности этиопатогенетической терапии. *Детские инфекции*. 2014. Т. 13(4). С. 41–45.
11. Лысенкова М.Ю., Каражас Н.В., Мелехина Е.В., Рыбалкина Т.Н., Веселовский П.А., Бурмистров Е.М., Бошьян Р.Е., Музыка А.Д., Горелов А.В. Герпесвирусные инфекции у детей с рецидивирующими респираторными заболеваниями. *Детские инфекции*. 2018. Т. 17(2). С. 17–21.
12. Kovaleva S.V., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Krutova V.A., Aslanyan I.E., Tulendinova A.I., Malinovskaya V.V., Matveevskaya K.Z., Mitropanova M.N. Target immunotherapy in immunocompromised children with comorbid diseases. *Allergy, asthma, copd, immunophysiology & norehabilitology: innovayive technologies. Filodiritto international proceedings. Bologna (Italy)*. 2019. P. 249–258.
13. Лусс Л.В. Вторичные иммунодефицитные состояния у детей. Взгляд клинициста к назначению иммуномодулирующей терапии. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2018. № 4(55). С. 4–18.
14. Маркова Т.П. Часто болеющие дети. Взгляд иммунолога. М: Торус Пресс. 2014. 191 с.
15. Нестерова И.В. Вторичные иммунодефициты и методы их коррекции в практике врача-оториноларинголога. Глава 2 в монографии «Иммунотерапия в практике ЛОР-врача и терапевта» под редакцией А.С. Симбирцева и Г.В. Лавреновой. 2018. С. 32–97.
16. Нестерова И.В., Харина Д.В. Двух-этапная иммунореабилитация детей раннего возраста из групп риска по частым и длительным возвратным респираторным инфекционно-вос-

- палительным заболеваниям. Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12 (21). № 4. С. 565–571.
17. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Малиновская В.В. Интерфероно- и иммунотерапия в реабилитации иммунокомпрометированных детей с возвратными респираторными инфекциями. Глава 7 в монографии «Иммунотерапия в практике ЛОР-врача и терапевта», под редакцией А.С. Симбирцева, Г.В. Лавриновой. СПб.: Диалог. 2018. С. 167–188.
 18. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М.: Медицина-Здоровье. 2019. 360 с.
 19. Raniszewska A., Górska E., Kotuła I., Stelmaszczyk-Emmel A., Popko K., Ciepela O. Recurrent respiratory tract infections in children – analysis of immunological examinations. *Central European Journal of Immunology*. 2015. V. 40(2). P. 167–173.
 20. Савенкова М.С., Караштина О.В., Шабат М.Б., Красева Г.Н., Абрамова Н.А., Красева Т.Е. Интерфероновый статус и выбор индукторов интерферонов у часто болеющих детей. *Детские инфекции*. 2016. № 2. С. 45–51.
 21. Esposito S., Michael R. Immunomodulation for recurrent respiratory tract infections: new insights and perspectives. *EMJ Respir*. 2016. V.4(10). P. 2–10.
 22. Schaad U.B., Esposito S., Razi C.H. Diagnosis and Management of Recurrent Respiratory Tract Infections in Children: A Practical Guide. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2016. 4(1): e31039. DOI: 10.5812/pedinfect.31039.
 23. Нестерова И.В. Интерфероны в практике клинициста: лучшие друзья или опасные враги? Аллергология и иммунология. 2016. Т. 17(3). С. 189–191.
 24. Нестерова И.В., Малиновская В.В., Тараканов В.А., Ковалева С.В. Интерфероно- и иммунотерапия в практике лечения часто и длительно болеющих детей и взрослых. Carigran Publishing, Inc. USA, UK, Russia. 2004. 158с.
 25. Романцов М.Г., Мельникова И.Ю. Часто болеющие дети: вопросы фармакотерапии (научный обзор). *Тетра medica*. 2014. № 1. С. 55–69.
 26. Сепиашвили Р.И. Основные принципы применения иммуномодулирующих препаратов в клинической практике // Аллергология и иммунология. 2015. Т. 15. № 1 С. 70–74.
 6. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Lobzin Yu.V., Tatochenko V.K., Uskov A.N., Vakhitov Kh.M. et al. Interferon inductors in prevention and treatment of respiratory infections in children. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2019;64(3):103–108. DOI: 10.21508/1027–4065–2019–64–3–103–108.
 7. Harada Y., Kinoshita F., Yoshida L.M., Minh L.N., Suzuki M., Morimoto K. et al. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J*. 2013; 32(5): 441–445. DOI: 10.1097/INF.0b013e31828ba08c.
 8. Kankasova M.N., Mokhova O.G., Pozdeeva O.S. Frequently ill children: an infectious disease physician’s view. *Practical Medicine*. 2014; 9(85): 67–71.
 9. Kornienko M.N., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Feklisova L.V., Savitskaya N.A. The role of opportunistic infections in etiology of acute respiratory diseases having a complicated course in frequently ill children. *Children Infections*. 2012; 11(3): 54–56.
 10. Levina A.S., Babachenko I.V. Persistent infections in children having frequent and long-term illnesses, opportunities of etiopathogenic therapy. *Children Infections*. 2014; 13(4):41–45. DOI.org/10.22627/2072–8107–2014–13–4–41–45
 11. Lysenkova M. Yu., Karazhas N.V., Melekhina E.V., Rybalkina T.N., Veselovskiy P.A., Burmistrov E.M. et al. Herpes virus infections in children having recurrent respiratory diseases. *Children Infections*. 2018; 17(2): 17–21.
 12. Kovaleva S.V., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Krutova V.A., Aslanyan I.E., Tulendinova A.I., Malinovskaya V.V., Matveevskaya K.Z., Mitropanova M.N. Target immunotherapy in immunocompromised children with comorbid diseases. Allergy, asthma, copd, immunophysiology & norehabilitology: innovayive technologies. *Filodiritto international proceedings. Bologna (Italy)*. 2019: 249–258.
 13. Luss L.V. Secondary immunodeficiency conditions in children. A clinician’s view on prescribing the immunomodulatory therapy. *Allergology and Immunology in Pediatrics*. 2018; 4(55): 4–18.
 14. Markova T.P. *Frequently ill children. An immunologist’s view*. M: Torus Press; 2014. 191p.
 15. Nesterova I.V. Secondary immune deficiencies and methods for correcting them in the practice of an ORL-specialist. Chapter 2 in the monograph «*Immunotherapy in the practice of ENT-specialist and primary care physician*», A.S. Simbirtsev, G.V. Lavrinova (Eds.); 2018: 32–97 p.
 16. Nesterova I.V., Harina D.V. Two-stage immunorehabilitation of early children age from risk groups for frequent and long-term return respiratory Infections and inflammatory diseases. *Russian immunological magazine*. 2018; 12 (21): 565–571.
 17. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Malinovskaya V.V. Interferon and immunotherapy in rehabilitation of immunocompromised children having relapsing respiratory infections. Chapter 7 in the monograph «*Immunotherapy in the practice of ENT-specialist and primary care physician*», A.S. Simbirtsev, G.V. Lavrinova (Eds.). St. Petersburg: Dialog; 2018: 167–188 p.
 18. Sepiashvili R.I. *Physiology of the immune system*. M.: Medicine-Health. 2019.360 p.
 19. Raniszewska A., Górska E., Kotuła I., Stelmaszczyk-Emmel A., Popko K., Ciepela O. Recurrent respiratory tract infections

References

1. Deryusheva A.V., Lvova I.I., Legotina N.S. Program Rationale of Treatment and Prevention in Children with Frequent Respiratory Diseases. *Children’s Infections*. 2017;1:15–20.
2. Gruzdeva O.V., Ulybina Ye.V., Verbianova O.M. Opportunities and mechanisms for compensatory development of frequently sick children of the senior preschool age. *Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V.P. Astafyev*. 2018;3(45):135–145.
3. Ivardava M.I. Use of immunomodulators in acute respiratory infection treatment in frequently ill children. *Voprosy sovremennoi pediatrii*. 2011;3:103–107.
4. Babachenko, I.V., Kvetnaya, A.S., Melnik, O.V., Levina, A.S. Pathogenesis of the formation of frequent respiratory illnesses in children having Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infection. *Infectology Journal*. 2011;3(4):67–72.
5. Balmasova, I.P., Malova, E.S., Sepiashvili, R.I. Viral and bacterial coinfections as a global issue of the modern medicine. *Bulletin of the PFUR. Series: Medicine*. 2018;22(1):29–42.

- in children – analysis of immunological examinations. *Central European Journal of Immunology*. 2015; 40(2): 167–173.
20. Savenkova M.S., Karashtina O.V., Shabat M.B., Kraseva G.N., Abramova N.A., Kraseva T.E. Interferon status and selection of interferon inducers in frequently ill children. *Children Infections*. 2016; 2: 45–51.
21. Esposito S., Michael, R. Immunomodulation for recurrent respiratory tract infections: new insights and perspectives. *EMJ Respir*. 2016; 4(10): 2–10.
22. Schaad U.B., Esposito S., Razi C.H. Diagnosis and Management of Recurrent Respiratory Tract Infections in Children: A Practical Guide. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2016;4(1): e31039. DOI: 10.5812/pedinfect.31039.
23. Nesterova I.V. Interferons in the practice of a clinician: best friends or dangerous enemies? *Allergology and Immunology*. 2016;17(3): 189–191.
24. Nesterova I.V., Malinovskaya V.V., Tarakanov V.A., Kovaleva S.V. *Interferono- and immunotherapy in the practice of treating often and long-term ill children and adults*. Hyattsville: Capricorn Publishing; 2004: 158 p.
25. Romantsov M.G., Melnikova I. Yu. Frequently ill children: questions of pharmacotherapy (a scientific review). *Terra medica*. 2014; 1: 55–69.
26. Sepiashvili R.I. Basic principles of the use of immunomodulatory drugs in clinical practice. *Allergology and immunology*. 2015; 15(1):70–74.

Ответственный за переписку: Халтурина Евгения Олеговна – доцент, кандидат медицинских наук, Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), 125009, Россия, г. Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 10. E-mail: jane_k@inbox.ru

Нестерова И.В. SPIN: 4714–2488; ORCID: 0000–0002–5339–4504

Ковалева С.В. SPIN: 8289–5342; ORCID: 0000–0002–9604–5806

Халтурина Е.О. SPIN: 2813–4952; ORCID: 0000–0002–8948–8983

Чудилова Г.А. SPIN: 2092–6412; ORCID: 0000–0001–8005–9325

Corresponding author: Khalturina E.O. – Associate Professor, PhD, Sechenov University, 125009, Russia, Moscow, Str. Mochovaya 11, bild.10. Email: jane_k@inbox.ru

Nesterova I.V. SPIN: 4714–2488, ORCID-0002–5339–4504

Kovaleva S.V. SPIN: 8289–5342, ORCID: 0000–0002–9604–5806

Khalturina E.O.. SPIN: 2813–4952, ORCID: 0000–0002–8948–8983

Chudilova G.A. SPIN: 2092–6412, ORCID: 0000–0001–8005–9325



КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ
CLINICAL PHYSIOLOGY. CASE REPORT

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-368-372

Псевдопелада Брока: клиническое наблюдение

С.К. Рябов¹, О.А. Меснянкина²

¹ООО Консилиум, г. Астрахань, Российская Федерация

²Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань, Российская Федерация

Аннотация. В статье представлено клиническое наблюдение редкого варианта рубцовой алопеции – псевдопелады Брока. Представленный случай демонстрирует важную роль детального обследования и пристального внимания к пациентам с длительно существующими очагами выпадения волос при отсутствии положительной динамики от проводимой терапии, сохранения клинической настороженности и проведения широкого дифференциально-диагностического поиска для исключения редко встречающихся дерматозов, а также подтверждает необходимость проведения гистологического исследования биоптатов кожи для верификации диагноза.

Ключевые слова: псевдопелада Брока, рубцовая алопеция, выпадение волос

Вклад авторов. Рябов С.К. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка материала; Меснянкина О.А. – концепция и дизайн исследования, обработка материала, анализ полученных данных, написание текста.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.06.2020. Принята 06.08.2020.

Для цитирования: Рябов С.К., Меснянкина О.А. Псевдопелада Брока: клиническое наблюдение // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 368–372. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-368-372

© Рябов С.К., Меснянкина О.А., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Pseudopelade of Brock: clinical observation

S.K. Ryabov¹, O.A. Mesnyankina²

¹L.L.C. Consilium, Astrakhan, Russian Federation

²Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

Annotation. The article presents clinical observation of a rare variant of scarring alopecia – pseudopelade Brock. The presented case demonstrates the important role of detailed examination and close attention to patients with long-term foci of hair loss in the absence of positive dynamics from the therapy, maintaining clinical alertness and conducting a broad differential diagnostic search to exclude rare dermatoses, and also confirms the need for histological examination of skin biopsies to verify the diagnosis.

Key words: pseudopelade of Brock, cicatricial alopecia, hair loss

Author contributions: Ryabov S.K. – research concept and design, collection of material, processing of material; Mesnyankina O.A. – research concept and design, processing of material, analysis of the obtained data, writing of the text.

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

Received 04.06. 2020. Accepted 06.08.2020

For citation: Ryabov S.K., Mesnyankina O.A. Pseudopelade of Brock: clinical observation. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4): 368–372. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-368-372

Псевдопелада Брока – редкое хроническое заболевание с медленно прогрессирующим течением, относящееся к группе рубцовых алопеций, чаще наблюдаемое у женщин старше 40 лет, при котором повреждение стволовых клеток волосяной сумки приводит к гибели волосяного фолликула [1]. Однако, по мнению ряда авторов, данный процесс может являться следствием других дерматозов, чаще воспалительного генеза, например красной волчанки [2–5]. И в то же время, отстаивая возможность существования самостоятельного диагноза псевдопелады Брока, исследователи выделяют специфические ее признаки [6].

Этиология данного заболевания окончательно не установлена [7]. Учеными рассматривается роль иммунологических нарушений [8], нейротрофических и эндокринных расстройств, а также интоксикаций [6].

Клинические проявления псевдопелады Брока характеризуются образованием небольших очагов

выпадения волос, имеющими тенденцию к периферическому росту и слиянию [1]. Кожа в очагах поражения имеет розоватую или белую окраску, фолликулярность отсутствует. В области очагов отмечается полное отсутствие волос или могут присутствовать единичные неизменные волосы в центре очага. Субъективные жалобы отсутствуют [9]. При псевдопеладе Брока очаги выпадения волос локализуются, как правило, в лобной и теменной областях [7], но могут затрагивать и другие участки кожного покрова, например, лица [10]. Установлено, что представители европеоидной расы страдают данным дерматозом чаще остальных [11]. Следует также отметить, что фолликулярный гиперкератоз и эритема как правило отсутствуют. Длительное прогредиентное течение дерматоза может приводить к тотальному облысению [12].

Псевдопеладу Брока необходимо дифференцировать с гнездной и диффузной алопецией, красной волчанкой, синдромом Литтла – Лассюэра, очаговой

склеродермией, трихотиломанией и декальвирующим фолликулитом. Решающую роль в постановке окончательного диагноза играет патоморфологическое исследование биоптатов кожи, при котором наблюдается атрофия эпидермиса, в дерме выявляют разрушение волосяных фолликулов, перифолликулярные лимфоцитарные инфильтраты, а также периваскулярные инфильтраты из лимфоцитов, плазмочитов и тучных клеток [9]. Информативным вспомогательным методом диагностики псевдопелады Брока является дерматоскопия, позволяющая визуализировать отличительные дерматоскопические признаки данного дерматоза: очаги фиброза и разветвленные сосуды [13].

Лечение псевдопелады включает назначение топических и системных глюкокортикостероидов, антималярийных препаратов, антиоксидантов, метаболических и вазоактивных средств.

Ниже приводим собственное клиническое наблюдение.

Пациентка М. 59 лет обратилась в клинику в феврале 2020 г. с жалобами на поредение волос на коже волосистой части головы.

Из анамнеза заболевания: считает себя больной с осени 2019 г., когда впервые обратила внимание на разрежение роста волос и появление очагов на коже волосистой части головы. Консультирована дерматологом поликлиники по месту жительства, был установлен диагноз «алопеция», назначена терапия: поливитаминные комплексы, настойка красного перца, косметические шампуни, Д Арсонваль. Терапию проводила в течение месяца, эффекта не отмечала.

Анамнез жизни: наследственность неотягощена. Перенесенные и сопутствующие заболевания: хронический гастрит, хронический панкреатит, остеохондроз шейного отдела позвоночника, отосклероз, атеросклероз аорты и церебральных сосудов, артериальная гипертония. Вредные привычки отрицает. Гемотрансфузий не было.

Status localis: Патологический процесс носит ограниченный характер, локализован на коже волосистой части головы в теменной области, представлен очагами алопеции неправильной формы, в пределах которых кожный покров обычной окра-

ски, умеренной плотности, местами блестящий, при пальпации безболезненный (рис. 1). Трихоскопически определяются участки фиброза, изолированные дистрофические волосы, фолликулярные устья отсутствуют (рис. 2).



Рис 1. Клинические проявления псевдопелады Брока у пациентки М., 59 лет.

Fig 1. Clinical manifestations of Broca's pseudopelada in a patient M., 59 years old.



Рис. 2. Клинические проявления псевдопелады Брока у пациентки М., 59 лет (трихоскопия)

Fig. 2. Clinical manifestations of Broca's pseudopelada in a patient M., 59 years (trichoscopy)

Данные лабораторных методов обследования (проведено пациенткой до обращения в клинику).

Биохимический анализ крови от 16.02.2020 г.: аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, общий билирубин, гамма-глутамилтранспептидаза, кальций, фосфор, сывороточное железо, ферритин, цинк в пределах референтных значений.

Свободный трийодтиронин, свободный тироксин, тиреотропный гормон, антитела к тиреоглобулину и тиреопероксидазе от 16.02.2020 г. в пределах референтных значений.

Кровь на микрореакцию – отрицательна.

Гистологическое исследование биоптата кожи от 08.05.2020 г.: эпидермис атрофичен, в дерме диффузный фиброз, небольшие диффузно расположенные очаги лимфогистиоцитарной инфильтрации с примесью фибробластов. Волосяные фолликулы и сальные железы отсутствуют, имеются в небольшом количестве потовые железы. Заключение: данная морфологическая картина может иметь место при псевдопелладе Брока.

На основании данных анамнеза, клинической картины и результатов гистологического исследования пациентке выставлен диагноз: L 66.8 Псевдопеллада Брока.

Представленный случай демонстрирует важную роль детального обследования и пристального внимания к пациентам с длительно существующими очагами выпадения волос при отсутствии положительной динамики от проводимой терапии, сохранения клинической настороженности и проведения широкого дифференциально-диагностического поиска для исключения редко встречающихся дерматозов, а также подтверждает необходимость проведения гистологического исследования биоптатов кожи для верификации диагноза.

Библиографический список

1. Жулимова Н. Л., Зильберберг Н.В., Римар О.Г. Псевдопеллада Брока как самостоятельное заболевание, подтвержденное клиническими и гистологическими признаками. *Лечащий врач*. 2014. № 9. С. 81–83.
2. Amato L., Mei S., Massi D., Gallerani I., Fabbri P. Cicatricial alopecia; a dermatopathologic and immunopathologic study of 33 patients (pseudopelade of Brocq is not a specific clinico-pathologic entity). *Int. J. Dermatol.* 2002. Vol. 41. N.1. P. 8–15.
3. Yu M., Bell R.H., Ross E.K., Lo B.K., Isaac-Renton M., Martinka M., Haegert A., Shapiro J., McElwee K.J. Lichen planopilaris and pseudopelade of Brocq involve distinct disease associated gene expression patterns by microarray. *J Dermatol Sci.* 2010. Vol. 57. N. 1. P. 27–36.
3. Мошкалова И. А., Михеев Г.Н., Соколовский Е.В. Фолликулярный декальвирующий красный лишай (обзор литературы и собственные наблюдения). Часть I. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2011. № 3. С. 72–75.
4. Альтмайер П. *Терапевтический справочник по дерматологии и аллергологии*. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003; 1248 с.
5. Елькин Д. В., Митрюковский Л.С., Седова Т.Г. *Избранная дерматология. Редкие дерматозы и дерматологические синдромы. Иллюстрированный справочник по диагностике и лечению дерматозов*. Пермь, 2004; 946 с.
6. Diwan N., Gohil S., Nair P.A. Primary idiopathic pseudopelade of Brocq: five case reports. *Int. J. Trichology.* 2014. Vol. 6. N 1. P. 27–30.
7. Moretti S., Amato L., Massi D., Bianchi B., Gallerani I., Fabbri P. Evaluation of inflammatory infiltrate and fibrogenic cytokines in pseudopelade of Brocq suggests the involvement of T-helper 2 and 3 cytokines. *Br J Dermatol.* 2004. Vol. 151. № 1. P. 84–90.
8. Корсунская И.М., Гусева С.Д., Невозинская З.А. К вопросу о псевдопелладе Брока. *Клиническая дерматология и венерология*. 2015. Т. 14. № 3. С. 17–21.
9. Madani S., Trotter M.J., Shapiro J. Pseudopelade of Brocq in beard area. *J Am Acad Dermatol.* 2000. Vol. 42(5). P. 895–896.
10. Alzolibani A.A., Kang H., Otberg N., Shapiro J. Pseudopelade of Brocq. *Dermatol Ther.* 2008. Vol. 2. N. 4. P. 257–263.
11. Мошкалова И. А., Михеев Г.Н., Соколовский Е.В. Фолликулярный декальвирующий красный лишай (обзор литературы и собственные наблюдения). Часть I. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2011. № 3. С. 72–75.
12. Минас С., Суколин Г.И., Крипичер О.А., Азам В.В. Дифференциальная диагностика дискоидной красной волчанки волосистой части головы, псевдопеллады Брока и декальвирующего фолликулита при помощи дерматоскопии. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2007. № 1. С. 31–36.

References

1. Zhulimova N. L., Zil'berberg N. V., Rimar O.G. Pseudopelada Broka kak samostoyatel'noe zabolevanie, podtverzhdennoe klinicheskimi i gistologicheskimi priznakami. *Lechashhij vrach*. 2014;9:81–83 (In Russ.).
2. Amato L., Mei S., Massi D., Gallerani I., Fabbri P. Cicatricial alopecia; a dermatopathologic and immunopathologic study of 33 patients (pseudopelade of Brocq is not a specific clinico-pathologic entity). *Int. J. Dermatol.* 2002;41(1):8–15.
3. Yu M., Bell R.H., Ross E.K., Lo B.K., Isaac-Renton M., Martinka M., Haegert A., Shapiro J., McElwee K.J. Lichen planopilaris and pseudopelade of Brocq involve distinct disease

- associated gene expression patterns by microarray. *J Dermatol Sci.* 2010;57(1):27–36.
4. Moshkalova I. A., Miheev G.N., Sokolovskij E.V. Follikuljarnyj dekal'viruyushchij krasnyj lishaj (obzor literatury i sobstvennye nablyudeniya). Chast' I. *Sovremennye problemy dermatovenerologii, immunologii i vrachebnoj kosmetologii.* 2011;3:72–75 (In Russ.).
 5. Al'tmajer P. *Terapevticheskiy spravochnik po dermatologii i allergologii.* M.: GEOTAR-MED. 2003.1248 p.
 6. El'kin D. V., Mitryukovskij L.S., Sedova T.G. Izbrannaya dermatologiya. Redkie dermatozy i dermatologicheskie sindromy. Illustrirovannyj spravochnik po diagnostike i lecheniyu dermatozov. Perm'. 2004. 946 p. (In Russ.).
 7. Diwan N., Gohil S., Nair P.A. Primary idiopathic pseudopelade of Brocq: five case reports. *Int. J. Trichology.* 2014;6(1):27–30.
 8. Moretti S., Amato L., Massi D., Bianchi B., Gallerani I., Fabbri P. Evaluation of inflammatory infiltrate and fibrogenic cytokines in pseudopelade of Brocq suggests the involvement of T-helper 2 and 3 cytokines. *Br J Dermatol.* 2004;151(1):84–90.
 9. Korsunskaya I.M., Guseva S.D., Nevozhinskaya Z.A. K voprosu o psevdopelade Broka. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya.* 2015. 14(3):17–21 (In Russ.).
 10. Madani S., Trotter M.J., Shapiro J. Pseudopelade of Brocq in beard area. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(5):895–896.
 11. Alzolibani A.A., Kang H., Otberg N., Shapiro J. Pseudopelade of Brocq. *Dermatol Ther.* 2008;2(4):257–263.
 12. Moshkalova I. A., Miheev G.N., Sokolovskij E.V. Follikuljarnyj dekal'viruyushchij krasnyj lishaj (obzor literatury i sobstvennye nablyudeniya). Chast' I. *Sovremennye problemy dermatovenerologii, immunologii i vrachebnoj kosmetologii.* 2011;3:72–75 (In Russ.).
 13. Minas S., Sukolin G.I., Kripicer O.A., Azam V.V. Differencial'naya diagnostika diskoidnoj krasnoj volchanki volosistoj chasti golovy, psevdopellady Broka i dekal'viruyushchego follikulita pri pomoshchi dermatoskopii. *Rossijskiy zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej.* 2007;1:31–36 (In Russ.).

Ответственный за переписку: Меснянкина Ольга Александровна – к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО Астраханский ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России; 414000, Россия, г. Астрахань, ул. М. Максаковой, д. 6. E-mail: olga_mesnyankina@mail.ru

Меснянкина О.А. SPIN: 7703–4137, ORCID ID: 0000–0003–1599–301X

Рябов С.К. SPIN: 6007–2649, ORCID ID: 0000–0003–4259–935X

Corresponding author: Mesnyankina Olga A. – PhD, MD, Associate Professor of the Department of Dermatology, Astrakhan State Medical University; 414000, Russia, Astrakhan, Maksakovoy str., 6. E-mail: olga_mesnyankina@mail.ru

Mesnyankina O.A. ORCID ID: 0000–0003–1599–301X

Ryabov S.K. ORCID ID: 0000–0003–4259–935X