

# РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ



## Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: МЕДИЦИНА

2021 Том 25 № 2

Тема номера: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2021-25-2

<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, Россия;

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

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

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

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

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

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

**КАТЕЛАРИС Конни**, профессор, Университет Западного Сиднея, Сидней, Австралия;

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

**КУСТОВИЦ Аднан**, профессор, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания;

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

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

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

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

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

RUDN University



## RUDN JOURNAL OF MEDICINE

2021 Том 25 № 2

Theme of the issue: EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2021-25-2

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

Founded in 1997

Founder: Peoples' Friendship University of Russia

---

### EDITORIAL BOARD

#### Editor-in-Chief

**Revaz I. SEPIASHVILI**, 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, Russia. *E-mail*: wipocis@gmail.com *ORCID ID*: orcid.org/0000-0001-6091-1381

#### Deputy Chief Editor

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

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

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

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

#### Executive Secretary

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

#### Members of Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Alexander D. NOZDRACHEV**, 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, Russia;

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

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

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

# 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, EBSCOhost.

## 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: [medj@rudn.ru](mailto:medj@rudn.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](mailto:publishing@rudn.ru)

### Почтовый адрес редакции

ул. Миклухо-Маклая, д. 8, Москва, Россия, 117198  
Тел.: +7 (910) 465-15-37  
e-mail: [medj@rudn.ru](mailto:medj@rudn.ru)

Подписано в печать 08.04.2021 Выход в свет 15.04.2021. Формат 70×100/16.

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

Усл. печ. л. 7,00. Тираж 500 экз. Заказ № 189. 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](mailto: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 Index of Science Citation, Electronic Journals Library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals, EBSCOhost.

### 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: [medj@rudn.ru](mailto:medj@rudn.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](mailto:publishing@rudn.ru)

**Postal Address of the Editorial Board:**  
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198  
Ph. +7 (495) 434-70-07; e-mail: [medj@rudn.ru](mailto:medj@rudn.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](mailto:publishing@rudn.ru)

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕМА НОМЕРА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

#### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ**

- Саху С.С., Чоудхари О.К., Бхадра Дж., Каби Б.С.**  
Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма гена BTNL2 с остеоартрозом коленного сустава ..... 89
- Бикбов М.М., Халимов А.Р., Суркова В.К., Казакбаева Г.М.**  
Оценка толщины роговицы *ex vivo* и *in vivo* при инстилляциях растворов фотосенсибилизатора в разных модификациях УФ кросслинкинга роговицы..... 96

#### **КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ**

- Халимов Т.А.**  
Особенности ангиогенеза при заболеваниях глаз ..... 106
- Тепляшина Е.А., Комлева Ю.К., Лычковская Е.В., Дейхина А.С., Салмина А.Б.**  
Регуляция нейрогенеза и церебрального ангиогенеза продуктами протеолиза клеточных белков ..... 114
- Емельянова А.С., Симонян Л.А., Степура Е.Е.**  
Анализ электрокардиограммы студентов с разным уровнем двигательной активности ..... 127
- Косолапова И.В., Дорохов Е.В., Коваленко М.Э., Лесников Р.В.**  
Функциональное взаимодействие жевательной мускулатуры у детей с аномалиями зубочелюстной системы..... 136
- Дурнова Н.А., Кланцатая А.Р., Курчатова М.Н., Каретникова А.Ю., Шереметьева А.С.**  
Оценка цитогенетического действия кофеина в микроядерном тесте..... 147
- Сундуков Д.В., Путинцев В.А., Шекера В.В., Богомоллов Д.В., Романова О.Л.**  
Использование современных судебно-медицинских методов посмертной диагностики кровопотери ..... 154

**CONTENTS****THEME OF THE ISSUE: EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY****EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY****Sahoo S.S., Choudhari O.K., Bhadra J., Kabi B.C.**

Association of BTNL2 gene single nucleotide polymorphism with knee osteoarthritis ..... 89

**Bikbov M.M., Khalimov A.R., Surkova V.K., Kazakbaeva G.M.**Estimation of corneal thickness ex vivo and in vivo at instillation of photosensitizer solutions  
in different modifications of UV corneal crosslinking..... 96**CLINICAL PHYSIOLOGY****Khalimov T.A.**

Features of angiogenesis in eye diseases ..... 106

**Teplyashina E.A., Komleva Y.K., Lychkovskaya E.V., Deikhina A.S., Salmina A.B.**

Regulation of neurogenesis and cerebral angiogenesis by cell protein proteolysis products ..... 114

**Emelyanova A.S., Simonyan L.A., Stepura E.E.**

Heart rate variability analysis of students with different motor activity levels ..... 127

**Kosolapova I.V., Dorokhov E.V., Kovalenko M.E., Lesnikov R.V.**

Functional interaction of chewing muscles in children with dentoalveolar system anomalies ..... 136

**Durnova N.A., Klantsataya A.R., Kurchatova M.N., Karetnikova A.Yu., Sheremetyeva A.S.**

Cytogenetic effect of caffeine in the micronucleus test. .... 147

**Sundukov D.V., Putintsev V.A., Shekera V.V., Bogomolov D.V., Romanova O.L.**

Use of modern forensic methods for post-mortem diagnosis of blood loss ..... 154



## EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-89-95

RESEARCH ARTICLE  
НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

### Association of BTNL2 gene single nucleotide polymorphism with knee osteoarthritis

S.S. Sahoo<sup>1\*</sup>, O.K. Choudhari<sup>1</sup>, J. Bhadra<sup>2</sup>, B.C. Kabi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vardhman Mahavir Medical College, Safdarjung Hospital, New Delhi, India

<sup>2</sup>Vallabhbai Patel Chest Institute, University of Delhi, Delhi, India

\*Corresponding author: [drsubhra71@gmail.com](mailto:drsubhra71@gmail.com)

**Abstract.** *Relevance.* Osteoarthritis (OA) is one of the chronic debilitating condition mostly seen in the aged population. The etiology behind the OA is multifactorial and the exact cause of the disease often remains uncertain. Apart from the conventional risk factors, there are the speculations of role of genetics playing a pivotal role in the causation of OA. The available literature showed BTNL2 gene polymorphism association with risk of Osteoarthritis whether the same relation is present in north Indian population needs to be elucidated. *Objective.* To find the association between single nucleotide polymorphism (SNP) (rs10947262) in BTNL2 gene and the susceptibility in knee Osteoarthritis (OA) subjects from northern Indian population. *Materials and Methods.* Blood samples of 100 patients of knee osteoarthritis and 100 healthy subjects were collected after institutional ethical clearance and participants consent. The BTNL2 gene fragment was amplified using Amplification Refractory Mutation System (ARMS-PCR) with predesigned primers after DNA extraction. The corresponding product bands were identified on the gel electrophoresis for 200 samples and the results were statistically analyzed. *Results and Discussion.* The genotypic distribution of the SNP followed Hardy-Weinberg Equilibrium. The genotype frequency analysis of the polymorphism was statistically significant ( $\chi^2=7.788$ ;  $P=0.005$ ) with Odd's Ratio of CT+TT/CC: OR=2.303;  $P=0.008$  revealing association of BTNL2 polymorphism with risk of Knee Osteoarthritis. *Conclusion.* The SNP (rs10947262) in the BTNL2 gene region is associated with risk of knee osteoarthritis.

**Key words.** Osteoarthritis, BTNL2 polymorphism, Cytokine, Knee

**Author contributions.** The authors made an equivalent contribution to the publication.

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

Received 09.12.2020. Accepted 11.02.2021.

© Sahoo S.S., Choudhari O.K., Bhadra J., Kabi B.C., 2021



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

**For citation:** Sahoo SS, Choudhari OK, Bhadra J, Kabi BC. Association of BTNL2 gene single nucleotide polymorphism with knee osteoarthritis. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):89—95. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-89-95

## Introduction

Geriatric population constitute a significant proportion of world total population. Geriatric age is often accompanied by senile disorders with restricted movement among the age group. Musculoskeletal deformities are often seen in this age along with hypertension, Diabetes Mellitus or other lifestyle disorders. Osteoarthritis (OA) is a age related joint disease causing significant disability in aged population of developed as well as developing countries standing as fourth leading cause of years lived with disability [1]. It is complex disease of multifactorial etiology including genetic and environmental factors [2]. It is basically inability to maintain the balance between cartilage breakdown and regeneration [3]. OA is considered as a non-inflammatory arthropathy however, inflammatory factors have also seen involved in the pathogenesis of OA [4].

Various risk factors for Osteoarthritis have been identified including Female gender, obesity, bony deformities and Joint injuries [5]. The propensity of this disease running in families is also observed and are associated with human leukocyte antigen (HLA) type I and II [6]. It is also seen that low-grade inflammation mediated by cytokines may occur in the OA [3]. While various studies tried to establish the genetic risk of having osteoarthritis among different ethnicities, a genome-wide association scan in Japanese population identified role of BTNL2 gene polymorphism strongly associated with knee OA [7]. The HLA class I and class II genes are responsible for the development of osteoarthritis apart from their essential role in self/non-self-immune recognition [8].

Some Asians have low risk of developing Osteoarthritis [9]. However, its prevalence in India was documented about 22 to 39 percent in one study [10]. Most of the Asian countries are developing one and many people are still devoid of essential nutrition. They

have high chance of getting OA via trauma or joint overuse or from genetic influence along with existing osteoporosis. Until now, 90 genetic variations are found to be associated with the risk of osteoarthritis [11]. These variations are heritable determinants for the causation of the disease and need to be studied further to understand the risk of osteoarthritis in the Indian Population.

## Materials and methods

The study was approved by the ethical committee of the Vardhman Mahavir Medical College and Safdarjung Hospital, New Delhi. All patients gave informed consent to participate in the study according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) and personal data processing. The basic parameters like age, weight, height, gender of each patient were noted. Cases included 100 adults of either gender above 45 years of age diagnosed as Osteoarthritis from Orthopedics Department while 100 apparently healthy adults of both the sexes, above 45 years of age without any history of joint pain or any other skeletal disorder were enrolled in the study. Diagnosis of Osteoarthritis of knee was done as per the criteria laid by American College of Rheumatology followed by taking radiographs of affected knee joint for radiological scoring by Kellgren and Lawrence scores (KL scores). A KL score of 2 or more was classified as OA. Diagnostic criteria of American college of Rheumatology includes knee pain with any 3 of the following criteria [12, 13]:

1. Over 50 years of age;
2. < 30 minutes of morning stiffness;
3. Crepitus on active motion;
4. Bony tenderness;
5. Bony enlargement;
6. No palpable warmth of synovium.

Participants having underlying comorbidity like

Rheumatoid arthritis, Gout, Congenital lower limb deformity or history of severe trauma to the affected joint were excluded from the study.

Under strict aseptic conditions 2 ml of venous blood was collected in EDTA vacutainer and stored at -70°C. The DNA isolation was done by «QIAGEN DNA extraction Kit» follow by amplification by polymerase chain reaction (PCR). The loci for BTNL2 gene SNP (rs10947262) was identified by using Amplification Refractory Mutation System (ARMS-PCR). The primers used for amplification were:

- ancestral gene sense strand (A):  
5'-GTCACCTACCAGCTATGTGAGTC-3';
- polymorphic gene Sense strand (P):  
5'-GTCACCTACCAGCTATGTGAGTT-3';
- common for antisense strand (R):  
5'-CAAACCAGTGCCTTAATCCAGC-3'.

Each 20 µl of PCR mixture consisted of 200–300 ng of Template DNA, 0.3 µl of sense and anti-sense primers in respective ancestral and polymorphic PCR tubes, 20 mM of MgCl<sub>2</sub> (present in PCR Buffer), 0.4 µl

of dNTPs (a mixture of 10 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.9 µl of 10X PCR buffer, 0.3 µl of Taq DNA polymerase, 17.7 µl of ddH<sub>2</sub>O (DNase/RNase-free) was used. The reaction mixture was subjected to denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, then a final extension at 72 °C for 5 min. 2 % Agarose gel electrophoresis was performed to view the PCR product of 421bp size.

*Statistical Analysis.* Quantitative variables were expressed as Mean ± SD. The differences in the general characteristics between the cases and the control group were evaluated via Student t-test. The difference in genotype distribution and sex ratio between the groups was evaluated by Pearson's  $\chi^2$  test. Genotypic and allelic frequencies were calculated by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test was applied to confirm the independent segregation of the alleles. Odd's Ratio (OR) was used to assess the association of SNP and osteoarthritis of the knee. A two-sided  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and discussion

A comparison of the baseline characteristics are mentioned in Table 1.

**Table 1**

**Baseline characteristics of participants**

Parameters	Cases (N=100)	Controls (N=100)	$\chi^2/ t$ value	p-value
Age, years	59.56±11.5	58.46±10.6	0.721	0.471
Female Gender, %	63	56	1.02	0.312
Weight, kg	78.85±11.5	76.76±19.3	0.930	0.353

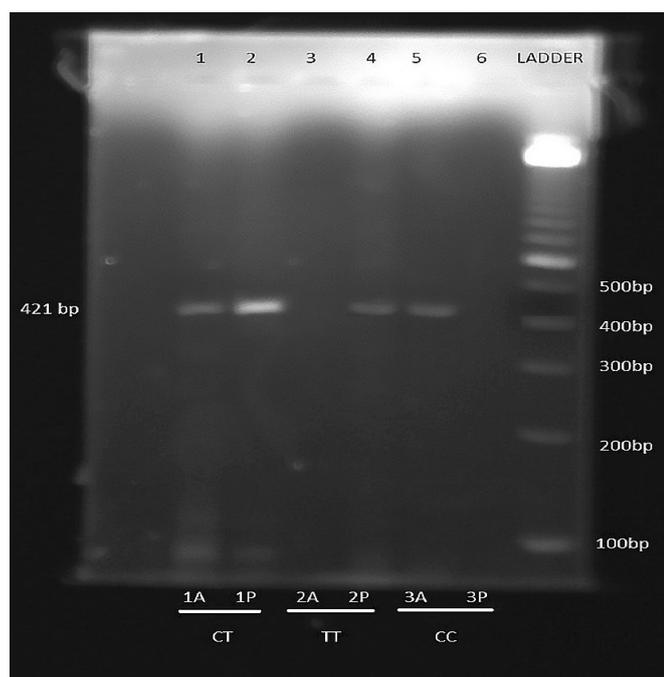
There was no significant difference between the mean age (years) 59.56±11.5 vs. 58.46±10.6, weight (kg) 78.85±11.5 vs. 76.76±19.3 as well as the sex ratio among the case and control groups ( $P > 0.05$ ).

The amplification of genomic DNA yielded PCR products of 421 base pairs (bp) on Agarose gel electrophoresis (Figure 1).

The PCR products were detected by comparing it with a DNA ladder which was ran along with the

PCR products, where CC (homozygous Ancestral), CT (heterozygous polymorphic), and TT (homozygous polymorphic). The SNP was within the Hardy-Weinberg equilibrium with  $P = 0.22$  (Table 2).

In this study, the SNP (rs10947262) in the Butyrophilin like 2 (BTNL2) gene region was evaluated using chi-square test. The genotype CT+ TT cumulatively was statistically significant ( $\chi^2 = 7.788$ ;  $P = 0.005$ ) (Table 3).



**Fig. 1.** Agarose gel picture of BTNL 2 gene SNP rs10947262. A- ancestral; P-polymorphic. Lane 1,2-Heterozygous (CT), Lane 3,4-Homozygous polymorphic (TT), Lane 5,6-Homozygous ancestral. bp=base pairs

When Odd’s Ratio (OR) was applied to find the association between the polymorphism and risk of Osteoarthritis, the OR values for SNP were statistically significant (CT+TT/ CC: OR=2.303; P=0.008) indicating the BTNL2 polymorphism is associated with risk of osteoarthritis (Table 3).

While various hypothesis in the causation of Osteoarthritis have been postulated, significant association of abnormal joint anatomy causing increased focal stress or an acute injury or chronic stress in obese individuals or a combined effect have been seen to cause the OA. The disease has association with the obese individuals bringing stress to joints and imbalance between cartilage regeneration and degradation however, persons well within normal BMI also have documented incidence of OA. Hence, the genetic variability needs to be known. Present treatment options include supportive management, Physiotherapy and joint replacement therapy and exploring the genetic susceptibility targeted management could help to prevent the disease itself or at least halt the progression of the disease as some osteoarthritis patients invariably will require joint replacement and joint replacement depends upon the socio-economic status of the patients [14].

**Table 2**

**Hardy Weinberg Equilibrium of SNP of rs10947262**

Alleles	Frequency/	$\chi^2$	P-value/
CC	73	3.027	0.22
CT	105		
TT	22		

**Table 3**

**Genotype frequency analysis of SNP & its association with risk of OA**

Alleles	Cases (N=100)	Controls (N=100)	$\chi^2$	P-value	ODD’S Ratio	P-value
CC	27	46	-	-	1 (ref)	-
CT	62	43	8.38	0.004*	2.456	0.006*
TT	11	11	1.192	0.274	1.704	0.324
CC/(CT+TT)	73	54	7.788	0.005*	2.303	0.008*

\*p<0.05

A large-scale study in European descent population involving more than 5000 cases of OA and more than 36000 controls revealed two SNPs rs10947262 and rs7775228 variants has no association with increased risk of OA [15]. This finding is contrary to our study findings where rs10947262, CT and TT genotype were associated with increased risk of osteoarthritis. Another Japanese study associated with two SNPs of BTNL2 region including our studied reference sequence showed significant association of these genotype with risk of OA [5]. The same association was also echoed in a Chinese study, where four SNP from BTNL2 gene region were evaluated rs41521946, rs28362677, rs28362678, rs28362675 and found significantly associated with knee osteoarthritis, similar to our study however, we have evaluated rs10947262 of the same gene [16]. In another study by Shi D et al. SNP rs10947262 was evaluated in Han Chinese and Australian Caucasian population [17]. This study showed no association of risk of osteoarthritis with SNP in Han Chinese population while same study revealed significant risk with Caucasian population, Similar to genome wide study conducted in European descent population.

Various immune cells including T cells, B cells, and macrophages are seen to be involved in the pathogenesis of OA same like Rheumatoid arthritis however, the role of cytokine directed therapy is seen in Rheumatoid arthritis and very few studies have echoed anti cytokine therapy in Osteoarthritis [18, 19]. BTNL2 gene is responsible for inhibition of T cell activation, which have role in osteoarthritis and its polymorphism may lead to unopposed T cell activation and joint damage [20]. Apart from this, when HLA II gets attached to the Antigen (wear & tear cartilage fragments), it activates the macrophages (APCs) which in turn releases IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , vascular endothelial GF, chemokine (CXCL12) [21]. It also releases osteoinductive factors (Bone Morphogenetic Proteins) which helps in osteophytes formation, IL-12 which is a inducer of Th1 cells that releases IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , where IL-2 promotes Th1 cell further differentiation [22, 23]. IFN- $\gamma$  induces macrophages & HLA-II expression & inhibit collagen type II synthesis that lead to decrease in cartilage formation [24]. CXCL12 induces migration and retention of monocytes into synovial membrane. These

then over all activates T cells that produce collagenase in the synovial membrane that lead to destruction of cartilage leading to OA [25, 26].

Hence further and extensive research in this field is required as the current treatments for OA are limited and insufficient to prevent the occurrence and progression of the disease. Genetic studies of OA patients can throw insight into the molecular mechanisms that lead to the progression of the diseases, including joint damage and pain and can provide new approach towards treatment as well as prevention of the disease.

## References

1. Musculoskeletal conditions. Who.int.2020.Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>. [Assessed 6<sup>th</sup> October 2020].
2. Tsezou A. Genetics/genomics in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2014;22:S4-S5.
3. Moos V, Menard J, Sieper J, Sparmann M, Müller B. Association of HLA-DRB1\*02 with osteoarthritis in a cohort of 106 patients. *Rheumatology*. 2002;41(6):666-669.
4. Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB. Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bull Hosp Jt Dis*. 2008;6(3):244–250.
5. Heidari B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I. *Caspian J Intern Med*. 2011;2(2):205-212.
6. Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-García V, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics*. 2008;9(8):542-547. doi:10.2174/138920208786847953
7. Nakajima M, Takahashi A, Kou I, Rodriguez-Fontenla C, Gomez-Reino JJ, Furuichi T et al. New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One*. 2010;5(3):e9723.
8. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889–899.
9. Osteoarthritis (OA). CDC 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm>. [Assessed 7<sup>th</sup> December 2020].
10. Symmons D, Mathers C, Pflieger B. Global Burden of Osteoarthritis in year 2000: Global burden of disease 2000 study. *World health report*. 2002;5:2.
11. Reynard L, Barter M. A year in review: genetics, genomics, epigenetics. *Osteoarthr Cartil*. 2019;28(3):S22.
12. Iraj Salehi-Abari. 2016 ACR Revised Criteria for Early Diagnosis of Knee Osteoarthritis. *Autoimmune Dis Ther Approaches*. 2016;3:118.
13. ACR Diagnostic Guidelines. Johns Hopkins Arthritis Center. 2020. Available from: [https://www.hopkinsarthritis.org/physician-corner/education/arthritis-education-diagnostic-guidelines/#class\\_knee](https://www.hopkinsarthritis.org/physician-corner/education/arthritis-education-diagnostic-guidelines/#class_knee). [Assessed 18<sup>th</sup> October 2020].
14. Wetterholm M, Turkiewicz A, Stigmar K, Hubertsson J, Englund M. The rate of joint replacement in osteoarthritis depends on the patient's socioeconomic status. *Acta Orthop*. 2016;87(3):245-251. doi:10.3109/17453674.2016.1161451

15. Valdes AM, Styrkarsdottir U, Doherty M, Morris DL, Mangino M, Tamm A et al. Large scale replication study of the association between HLA class II/BTNL2 variants and osteoarthritis of the knee in European descent populations. *PLoS One*. 2011;6:e23371.
16. Sun W, Min H, Zhao L. Association of BTNL2 single nucleotide polymorphisms with knee osteoarthritis susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(10):3921-3927
17. Shi D, Zheng Q, Chen D, Zhu L, Qin A, Fan J et al. Association of single nucleotide polymorphisms in HLA class II/III region with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(11):1454-7.
18. Maini RN, Taylor PC. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med*. 2000;51:207-29. doi: 10.1146/annurev.med.51.1.207.
19. Grunke M, Schulze-Koops H. Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumor necrosis factor blockade. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65:555-556
20. Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, Dong C. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol*. 2006;176(12):7354-7360.
21. Ulvestad E, Williams K, Bø L, Trapp B, Antel J, Mørk S. HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology*. 1994;82(4):535-541.
22. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including characterization of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis*. 1988;47:300-307.
23. Sakkas LI, Johanson NA, Scanzello CR, Platsoucas CD. Interleukin-12 is expressed by infiltrating macrophages and synovial lining cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cell Immunol*. 1998;188:105-110.
24. Goldring MB, Sandell LJ, Stephenson ML, Krane SM. Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. *J Biol Chem*. 1986;261:9049-9055.
25. Schlaak JF, Schwarting A, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Mayet W. Effects of Th1 and Th2 cytokines on cytokine production and ICAM-1 expression on synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 1995;54:560-565.
26. Blades MC, Ingegnoli F, Wheller SK, Manzo A, Wahid S, Panayi GS et al. Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID mice. *Arthritis Rheum*. 2002;46:824-836.

## Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма гена BTNL2 с остеоартрозом коленного сустава

С.С. Саху<sup>1\*</sup>, О.К. Чоудхари<sup>1</sup>, Дж. Бхадра<sup>2</sup>, Б.С. Каби<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медицинский колледж Вардхмана Махавира, больница Сафдарджунг, г. Нью-Дели, Индия

<sup>2</sup>Институт груди Валлабхая Пателя, Университет Дели, г. Дели, Индия

\*drsubhra71@gmail.com

**Аннотация.** *Актуальность.* Остеоартрит (ОА) является одним из хронических заболеваний, чаще всего наблюдаемым у пожилых людей. Этиология остеоартрита многофакторна, и точная причина заболевания часто остается неопределенной. Помимо общепринятых факторов риска существуют предположения о том, что генетика играет ключевую роль в возникновении ОА. В литературе показана связь полиморфизма гена BTNL2 с риском остеоартрита, необходимо выяснить, присутствует ли такая же связь в популяции северной Индии. *Цель.* Определить, существует ли связь между однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) (rs10947262) в гене BTNL2 и восприимчивостью к остеоартриту (ОА) коленного сустава из населения Северной Индии. *Материалы и методы.* Образцы крови 100 пациентов с остеоартрозом коленного сустава и 100 здоровых доноров были собраны после разрешения этического комитета Медицинского колледжа Вардхмана Махавира и согласия участников. Фрагмент гена BTNL2 амплифицировали с использованием системы устойчивых к амплификации мутаций (ARMS-PCR) с предварительно созданными праймерами после экстракции ДНК. Соответствующие полосы продукта были идентифицированы с помощью гель-электрофореза для 200 образцов, а результаты были проанализированы статистически. *Результаты и обсуждение.* Генотипическое распределение SNP соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Анализ частоты генотипов полиморфизма был статистически значимым ( $\chi^2 = 7,788$ ;  $P = 0,005$ ) с отношением шансов СТ + ТТ / СС: OR = 2,303;  $P = 0,008$  указывает на связь полиморфизма BTNL2 с риском остеоартрита коленного сустава. *Выводы.* SNP (rs10947262) в области гена BTNL2 связан с риском остеоартрита коленного сустава.

**Ключевые слова:** остеоартрит, полиморфизм BTNL2, цитокин, колено

**Вклад авторов:** авторы внесли равный вклад в подготовке рукописи.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 09.12.2020. Принята 11.02.2021.

**Для цитирования:** *Sahoo S.S., Choudhari O.K., Bhadra J., Kabi B.C.* Association of BTNL2 gene single nucleotide polymorphism with knee osteoarthritis // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 89—95. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-89-95

*Corresponding author:* Subhra Sucharita Sahoo, Senior Resident Department of Biochemistry, college building, VMMC & Safdarjung Hospital, 110029, New Delhi, India. E-mail: drsubhra71@gmail.com

Sahoo S.S. ORCID: 0000-0003-0297-7002

Choudhari O.K. ORCID: 0000-0001-9993-090X

Bhadra J. ORCID: 0000-0003-2417-2248

Kabi B.C. ORCID: 0000-0002-5611-9225

*Ответственный за переписку:* Субхра Сучарита Саху, старший ординатор кафедры биохимии, Индия, 110029, г. Нью-Дели, здание колледжа ВММС и больницы Сафдаржунг. E-mail: drsubhra71@gmail.com

Саху С.С. ORCID: 0000-0003-0297-7002

Чоудхари О.К. ORCID: 0000-0001-9993-090X

Бхадра Дж. ORCID: 0000-0003-2417-2248

Каби Б.С. ORCID: 0000-0002-5611-9225

DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-96-105

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ  
RESEARCH ARTICLE

## Оценка толщины роговицы *ex vivo* и *in vivo* при инстилляциях растворов фотосенсибилизатора в разных модификациях УФ кросслинkinга роговицы

М.М. Бикбов, А.Р. Халимов, В.К. Суркова, Г.М. Казакбаева\*

Уфимский НИИ глазных болезней, г. Уфа, Российская Федерация  
\*gyulli.kazakbaeva@gmail.com

**Аннотация.** Цель. Выявить особенности действия и провести оценку эффективности растворов фотосенсибилизатора в эксперименте в разных модификациях стандартного кросслинkinга роговицы. *Материалы и методы.* Эксперименты выполнены на 32 энуклеированных глазах свиней *ex vivo* и на 12 кроликах (24 глаза) *in vivo*, разделенных на 4 группы в зависимости от вида инстиллируемого раствора фотосенсибилизатора: Декстралинк, Риболинк, Гиполинк и «Рибофлавин». Исследования насыщения роговицы производились двумя модификациями стандартного ультрафиолетового кросслинkinга роговицы: в первом случае инстилляции раствора фотосенсибилизатора выполняли в течение всей процедуры кросслинkinга (30 мин — насыщение и 30 мин — ультрафиолетовое облучение); во втором случае закапывания продолжались только в течение первых 30 мин, а в процессе ультрафиолетового облучения (30 мин) прекорнеальная пленка рибофлавина удалялась и инстилляции растворов не производились. *Результаты и обсуждение.* При инстилляциях растворов фотосенсибилизатора в течение 60 минут установлены следующие изменения: для Декстралинка характерно снижение толщины роговицы — на 24 % *ex vivo* и *in vivo* — на 21 %, Гиполинк, напротив, вызывал ее увеличение на 9 % и 23 % соответственно. Применение Риболинка и Рибофлавина практически не изменяло линейные параметры роговицы в течение всего срока наблюдения. Результаты 2-й серии исследований показали, что эффекты растворов, оказываемые на роговицу при их инстилляциях 30 минут, в целом сохранялись в течение всего срока наблюдения до 60 минут. В группе, где использовали растворы Декстралинка и Гиполинк, выявлена незначительная тенденция к восстановлению исходных параметров роговицы. *Выводы.* Безопасное и эффективное выполнение стандартного кросслинkinга роговицы возможно на основе рационального подхода к выполнению этапов насыщения стромы растворами фотосенсибилизатора в зависимости от исходного состояния роговицы: средство Декстралинка рекомендовано при толщине более 450 мкм, Риболинк — 400—450 мкм, Гиполинк — от 350 до 400 мкм. Прекращение инстилляций растворов на насыщенную рибофлавином роговицу в период ультрафиолетового облучения целесообразно проводить под интраоперационным контролем ее толщины. При выполнении стандартной техники кросслинkinга, где этап УФ облучения роговицы сопровождается инстилляциями раствора фотосенсибилизатора, необходимо учитывать наличие прекорнеальной пленки, способной поглощать часть энергии излучения в слоях стромы. Особенность данной техники кросслинkinга можно рассматривать в качестве потенциального способа защиты интраокулярных тканей от избыточного воздействия ультрафиолетового излучения, в частности при сшивании тонких роговиц.

**Ключевые слова:** кросслинkinг роговицы, кератоконус, Рибофлавин, роговица, толщина роговицы

**Вклад авторов.** М.М. Бикбов — концепция исследования, написание текста; А.Р. Халимов — дизайн исследования, написание текста; В.К. Суркова — анализ полученных данных, написание текста; Г.М. Казакбаева — сбор и обработка

© Бикбов М.М., Халимов А.Р., Суркова В.К., Казакбаева Г.М., 2021



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

материалов, анализ полученных данных, написание текста.

**Информация о конфликте интересов.** Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Поступила 11.11.2020. Принята 11.12.2020.

**Для цитирования:** Бикбов М.М., Халимов А.Р., Суркова В.К., Казакбаева Г.М. Оценка толщины роговицы *ex vivo* и *in vivo* при инстилляциях растворов фотосенсибилизатора в разных модификациях УФ кросслинkinга роговицы // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 96—105. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-96-105

## Estimation of corneal thickness *ex vivo* and *in vivo* at instillation of photosensitizer solutions in different modifications of UV corneal crosslinking

M.M. Bikbov, A.R. Khalimov, V.K. Surkova, G.M. Kazakbaeva\*

Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia

\*Corresponding author: gyulli.kazakbaeva@gmail.com

**Annotation.** *Objectives:* to evaluate the effectiveness of photosensitizer solutions in the experiment in different modifications of standard UV corneal crosslinking. *Materials and Methods.* Experiments were performed on 32 enucleated porcine eyes *ex vivo* and 12 rabbits (24 eyes) *in vivo*, divided into 4 groups depending on instillations of the photosensitizer solutions: «Dextralink», «Ribolink», «Hypolink» and «Riboflavin». Evaluation of corneal saturation was performed using two modifications of standard UV CXL: in the first case, instillation of the photosensitizer solution was performed during the entire crosslinking procedure (30 min — saturation and 30 min — ultraviolet irradiation); in the second case, instillations lasted only for the first 30 minutes, the precorneal riboflavin film was removed, and instillation of solution was not performed. *Results and Discussion.* Instillation of photosensitizer solutions within 60 minutes showed that Dextralink significantly reduced the thickness of the cornea by about 24 % *ex vivo* and 21 % *in vivo*, while Hypolink, on the contrary, caused its increase by 9 % *ex vivo* and 23 % *in vivo*, respectively. The use of Ribolink and Riboflavin did not change the linear parameters of the cornea during the entire follow-up period. The results of the 2nd series of studies showed that effects of solutions on the cornea during their instillation for 30 minutes were generally preserved during the entire observation period up to 60 minutes. In the group where Dextralink and Hypolink solutions were used, there was a slight tendency to normalization of the initial parameters of the cornea. *Conclusion.* Safe and effective implementation of UV crosslinking of the cornea is possible on the basis of a rational approach to the performing the stages of stroma saturation with photosensitizer solutions, depending on the initial state of the cornea: Dextralink is recommended for a thickness of more than 450  $\mu\text{m}$ , Ribolink — at 400—450  $\mu\text{m}$ , Hypolink — from 350 to 400  $\mu\text{m}$ . Halting of instillations on the saturated stroma during UV irradiation is advisable to be accompanied by intraoperative control of its thickness. When performing a standard crosslinking technique, where instillations of photosensitizer accompany the stage of UV irradiation of the cornea, it is necessary to take into account the presence of a precorneal film that can absorb some of the radiation energy. The peculiarity of this crosslinking technique can be considered as a potential way to protect intraocular tissues from excessive exposure to UV radiation.

**Keywords:** corneal crosslinking, riboflavin, keratoconus, cornea, corneal thickness

**Author contributions.** Mukharram M. Bikbov — the concept of the research, writing manuscript; Azat R. Khalimov — study design, writing manuscript; Valentina K. Surkova — analysis of data, writing manuscript; Gyulli M. Kazakbaeva — data collection and processing, analysis of data, writing manuscript.

**Conflicts of interest statement.** The authors have no a financial interest in any material or method mentioned. There is no conflict of interests.

Received 11.11.2020. Accepted 11.12.2020.

**For citation:** Bikbov MM, Khalimov AR, Surkova VK, Kazakbaeva GM. Estimation of corneal thickness ex vivo and in vivo at instillation of photosensitizer solutions in different modifications of UV corneal crosslinking. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):96—105. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-96-105

## Введение

Эффективность кросслинкинга обеспечивается наличием фотосенсибилизатора (рибофлавин) в роговице, который под воздействием ультрафиолетового (УФ) излучения (370 нм) способствует образованию триплетного рибофлавина и ряда активных форм кислорода, необходимых для формирования перекрестных связей в коллагеновом волокне [1—3]. В клинической практике широко применяется протектор роговицы Декстралинк, содержащий 0,1 % рибофлавина мононуклеотид с 20 % полимером декстран 500 kDa (Россия, рег. удостоверение № ФСР 2010/09071), который не только обеспечивает необходимое содержание фотосенсибилизатора (ФС) в строме, но и формирует рибофлавиновую прекорнеальную пленку [3]. Стабильность последней имеет значение для качественного насыщения стромы ФС и, соответственно, эффективного выполнения процедуры кросслинкинга роговицы (CXL) [4].

Состояние линейных параметров роговицы в соответствии с протоколом CXL является ключевым показателем точного дозирования ультрафиолета в слоях роговой оболочки. Внедрение селективных фотосенсибилизаторов, позволяющих не только насыщать строму рибофлавином, но обеспечивать возможность выполнения CXL на роговицах в различном диапазоне ее толщины, повысит критерии безопасности и эффективности процедуры.

Большой практический и научный интерес представляют исследования динамики изменений толщины роговицы на протяжении стандартной процедуры кросслинкинга (30 минут — насыщение стромы ФС и 30 минут — УФ облучение). В настоящее время офтальмологи используют две модификации стандартного CXL, отличающиеся тем, что одна техника предполагает инстилляцию раствора ФС в процессе УФ облучения, другая — выполняется без закапывания ФС при воздействии ультрафиолета. Соответственно, в первом случае защитная прекорнеальная пленка

рибофлавина является дополнительным барьером для УФ излучения, в последнем она отсутствует [5, 6].

Настоящие экспериментальные исследования проведены с целью выявления особенностей влияния растворов фотосенсибилизатора на толщину роговицы.

## Материалы методы

Исследование одобрено комиссией Этического комитета Уфимского НИИ глазных болезней. Экспериментальное исследование было проведено на 32 энуклеированных свиных глазах (не позднее 2 ч после изъятия) и на 12 кроликах (24 глаза) породы Шиншилла, которые были разделены на 4 группы в зависимости от вида, используемого для инстилляций ФС, которые были разработаны в Уфимском НИИ глазных болезней:

— Декстралинк — 0,1 % рибофлавина мононуклеотид с 20 % декстраном (рег. удостоверение № ФСР 2010/09071) [7];

— Риболинк — 0,1 % рибофлавина мононуклеотид с 1,0 % гидроксипропилметилцеллюлозой (ГМПЦ) [8];

— Гиполинк — 0,1 % рибофлавина мононуклеотид на гипотонической основе [9];

— Рибофлавин — 0,1 % рибофлавина мононуклеотид на изотонической буферной основе.

Все эксперименты проводились в соответствии с нормативными документами, регламентирующими гуманное обращение с животными и порядок проведения лабораторных исследований.

Измерения линейных параметров свиных роговиц ex vivo и роговиц глаз кроликов in vivo при использовании ФС производились по 2 методикам: в 1-й серии экспериментов — инстилляцией исследуемых средств выполняли в течение 60 минут наблюдений,

во 2-й — только 30 минут, при этом во избежание пересыхания поверхности роговицы в интервале от 30 до 60 минут закапывали физраствор из расчета 1 капля / 4 минуты.

Модель этапа насыщения стромы ФС при проведении процедуры стандартного УФ кросслинkingа с деэпителизацией здоровой роговицы кроликов производилась *in vivo* при анестезиологическом пособии препаратами «Золетил» 15 мг/кг (Valdepharm, Франция), «Ксилазин» 20 мг/кг («Ветфарм», Беларусь) внутримышечно и инстилляциях глазных капель 0,4 % оксибупрокаина («Инокаин», Индия). Деэпителизацию (Epi-Off) проводили микрохирургическим шпателем на участке роговицы, отмеченном метчиком, диаметром 9 мм с использованием операционного микроскопа Carl Zeiss (Германия). В послеоперационном периоде двукратно в течение 3-х дней закапывали антибактериальные средства (левофлоксацин 0,5 %, «Белмедпрепараты», Беларусь).

Оценку толщины роговицы проводили в течение 60 минут (с интервалом 5 минут). Измерения свиной роговицы выполняли в центральной зоне с помощью микрометра Digital linear gauge EG-100 (Япония). Для определения прижизненной толщины роговицы

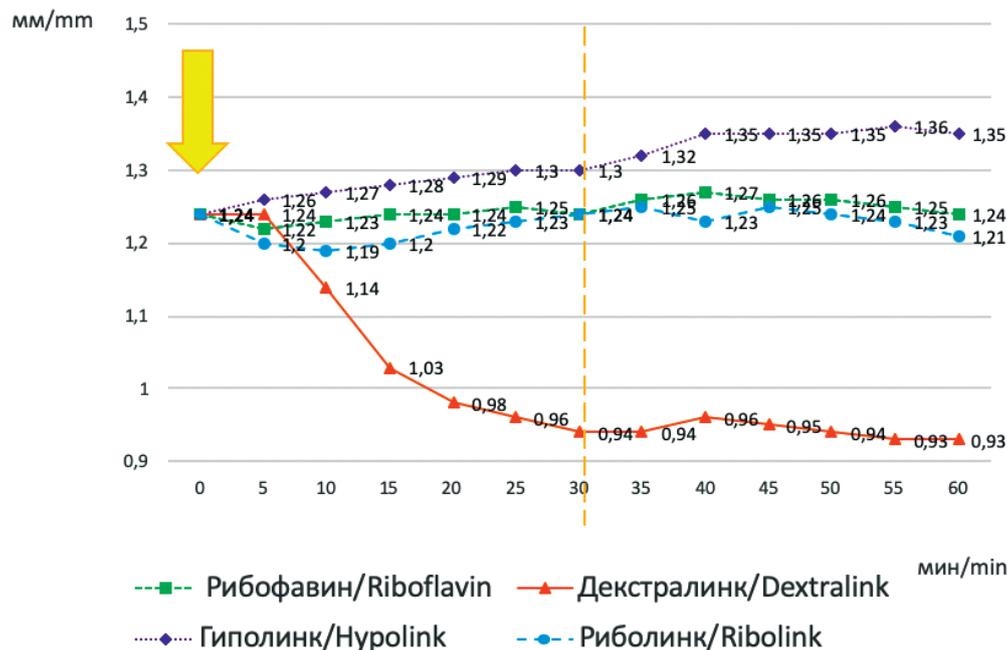
кроликов в режиме реального времени применяли оптическую когерентную томографию («Vizante OCT», Carl Zeiss, Германия). Регистрация значений толщины роговицы кроликов осуществлялась в 3-х точках: в центре роговицы и в 3 мм от центра.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программ Microsoft Excel 2010 и Statistika 6.0.

## Результаты и обсуждение

Измерение толщины свиных роговиц *ex vivo* без эпителия до начала инстилляций позволило определить их среднее значение —  $1,25 \pm 0,05$  мм.

При закапываниях раствора Декстралинк, начиная с 10 минуты наблюдений, выявлено статистически достоверное снижение толщины роговицы на 8 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). К 30—60-й минуте эксперимента значения исследуемого показателя были в пределах от  $0,94 \pm 0,07$  до  $0,93 \pm 0,09$  мм, что на 24 % ( $p < 0,05$ ) ниже исходного уровня.



**Рис. 1.** Динамика изменений толщины свиных роговиц *ex vivo* при инстилляциях растворов фотосенсибилизатора (Рибофлавин, Декстралинк, Гиполинк, Риболинк) для УФ кросслинkingа в течение 60 минут. По оси абсцисс — период наблюдений (мин), по оси ординат — толщина роговицы (мм). Стрелкой отмечен этап деэпителизации (Epi-Off)

**Fig. 1.** Dynamics of changes in the thickness of porcine corneas *ex vivo* during instillation of photosensitizer solutions (Riboflavin, Dextralink, Hypolink, Ribolink) for UV crosslinking for 60 minutes. The abscissa shows the observation period (minutes), y-axis is the thickness of the cornea (mm). The arrow marks the stage of de-epithelization (Epi-Off)

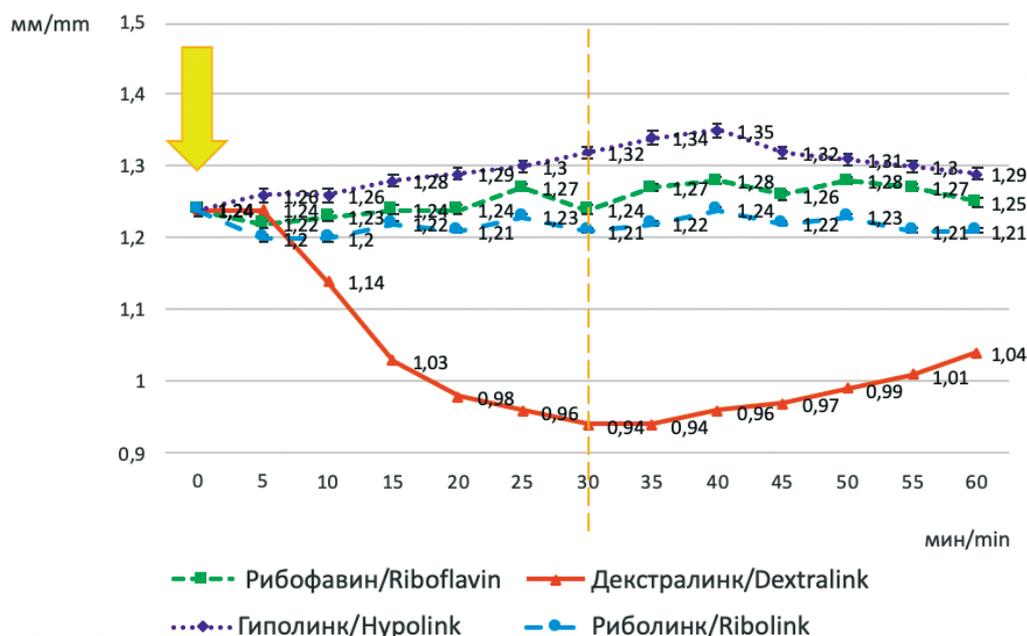
Нами выявлено однотипное действие исследуемых растворов Риболинк и Рибофлавин, которые на протяжении 60 минут не влияли на изменение исходной толщины роговицы. Следует отметить, что для обеспечения полноценной диффузии раствора ФС в строму частота инстилляций изотонического Рибофлавина и полимерсодержащего средства Риболинк была различной: соответственно, 1 капля в минуту против 1 капли в 2 минуты.

При использовании средства Гиполинк регистрировали невыраженный рост толщины свиной роговицы *ex vivo*, начиная с 15 минуты эксперимента — примерно на 3 % по сравнению с исходными

данными. К 40-й минуте наблюдения отмечали наибольшее повышение толщины роговицы — на 9 %.

Во 2-й серии экспериментов *ex vivo* (без инстилляций ФС с 30 по 60 мин) динамика толщины свиной роговицы в группах, где применяли растворы изотонического Рибофлавина и Риболинк, не претерпела видимых изменений (рис. 2).

При инстилляциях раствора Декстралинк к 30-й минуте отмечали снижение толщины роговицы на 24 % ( $p < 0,05$ ), которое сохранялось до 35-й минуты наблюдений с последующей слабо выраженной тенденцией к нормализации показателя (рис. 2).



**Рис. 2.** Динамика изменений толщины свиной роговицы *ex vivo* при инстиляции растворов фотосенсибилизатора (Рибофлавин, Декстралинк, Гиполинк, Риболинк) для УФ кросслинкинга в течение 30 минут. По оси абсцисс — период наблюдений (мин), по оси ординат — толщина роговицы (мм). Стрелкой отмечен этап деэпителизации (Epi-Off)

**Fig. 2.** Dynamics of changes in pig corneal thickness *ex vivo* during instillation of photosensitizer solutions (Riboflavin, Dextralink, Hypolink, Ribolink) for UV cross-linking within 30 minutes. The abscissa shows the observation period (minutes), y-axis is the thickness of the cornea (mm). The arrow marks the stage of de-epithelization (Epi-Off)

В целом, дегидратирующее действие декстрана, входящего в состав раствора Декстралинк, отмечалось в период от 15 до 60 минуты, несмотря на прекращение его инстилляций.

Применение раствора Гиполинк *ex vivo* способствовало увеличению толщины роговицы на 8 % до 40-й минуты эксперимента. В последующий

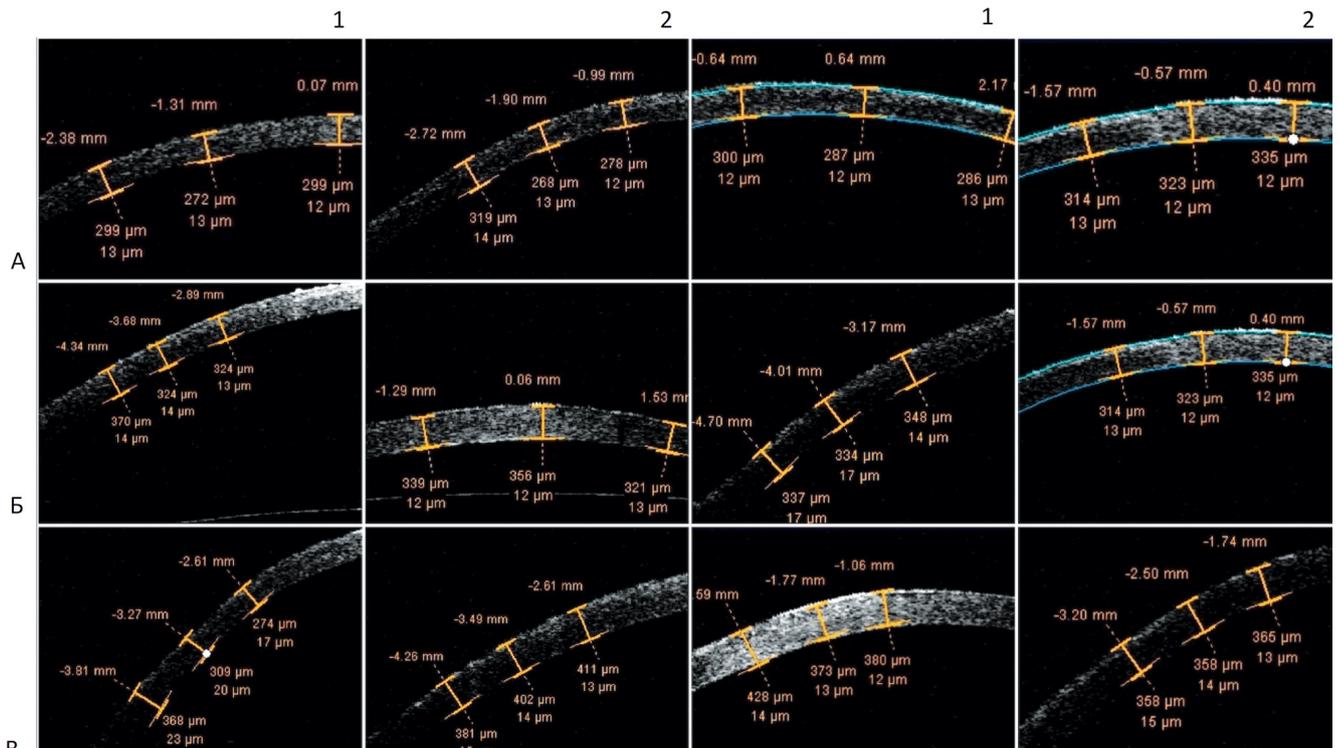
временной промежуток отмечали снижение толщины роговицы практически до исходных значений.

Проведенные исследования *in vivo* методом оптической когерентной томографии (ОКТ) показали следующее. При воспроизводстве модели стандартного УФ кросслинкинга с деэпителизацией отмечали снижение толщины роговицы в среднем

на 38—52 мкм. На рисунке 3 показана динамика изменений толщины роговицы кроликов в течение 60 минут инстилляций ФС.

Как и в предыдущих экспериментах *ex vivo*, данные ОКТ *in vivo* показали (рис. 4), что после на-

сыщения стромы роговицы раствором Декстралинк толщина деэпителизированной роговицы кролика к 30 минутам уменьшилась до  $269 \pm 18$  мкм (на 21 %). Такое состояние роговицы сохранялось до 60-й минуты эксперимента.



**Рис. 3.** Оптическая когерентная томография роговицы кроликов при инстиляции растворов фотосенсибилизатора: А — Декстралинк, Б — Риболинк, В — Гиполинк. Длительность инстилляций фотосенсибилизатора: 1—30 минут; 2—60 минут

**Fig. 3.** Optical coherence tomography of the cornea of rabbits during instillation of photosensitizer solutions: a-Dextralink, B-Ribolink, C – Hypolink.

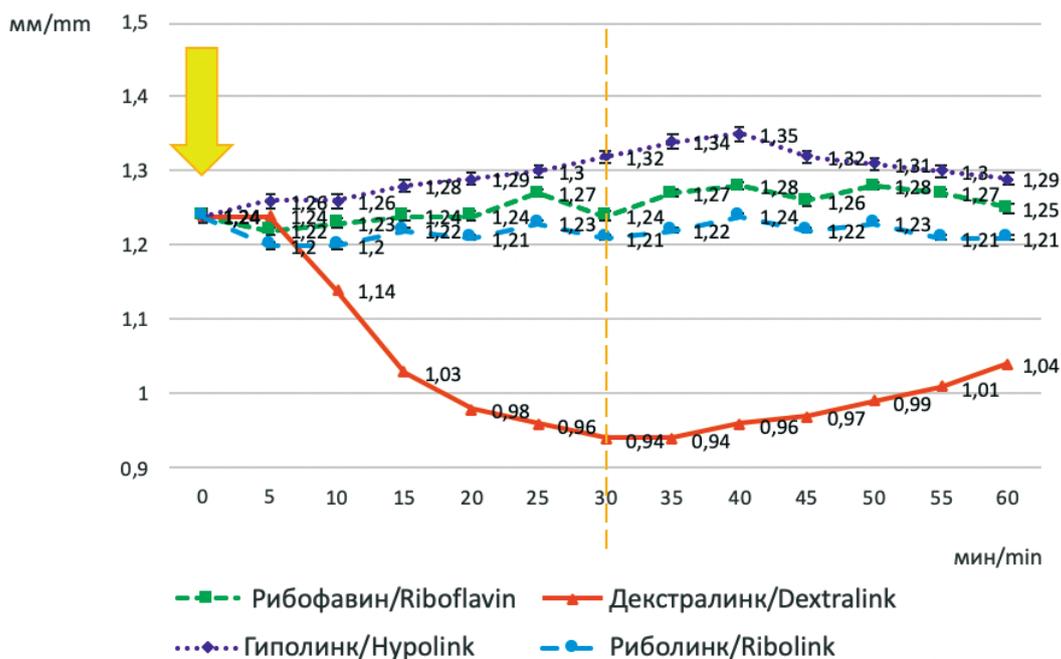
The duration of instillation of the photosensitizer: 1—30 minutes; 2—60 minutes

Продолжающиеся в течение 60 минут наблюдений инстилляций растворов Риболинк и изоосмотического Рибофлавина практически не изменяли значения толщины роговицы, были, соответственно, в пределах  $346 \pm 24$  мкм и  $349 \pm 21$  мкм (рис. 3). При этом Риболинк по сравнению с изоосмотическим раствором Рибофлавина создавал более устойчивую прерорнеальную полимерную пленку.

Закапывание средства Гиполинк на деэпителизованную поверхность роговицы кролика

способствовало повышению ее толщины за счет гидратации стромы, достигая максимума ( $420 \pm 12$  мкм) через 40 минут наблюдений (рис. 3). Прирост толщины роговицы составил 23 % от исходного состояния.

Во второй серии проведенных нами экспериментов *in vivo* (без инстилляций ФС на 30—60 мин) также показано выраженное дегидратирующее действие раствора Декстралинк.



**Рис. 4.** Динамика изменений толщины роговиц кроликов *in vivo* в центральной зоне при инстилляции растворов фотосенсибилизатора (Рибофлавин, Декстралинк, Гиполинк, Риболинк) для УФ кросслинкинга в течение 60 минут. По оси абсцисс — период наблюдений (мин), по оси ординат — толщина роговицы (мкм). Стрелкой отмечен этап деэпителизации (Epi-Off)

**Fig. 4.** Dynamics of changes in the corneal thickness of rabbits *in vivo* in the Central zone during instillation of photosensitizer solutions (Riboflavin, Dextralink, Hypolink, Ribolink) for UV crosslinking for 60 minutes. The abscissa shows the observation period (min), y-axis — thickness of cornea ( $\mu\text{m}$ ). The arrow marks the stage of de-epithelization (Epi-Off)

Результатом характерного обезвоживания стромы явилось снижение толщины роговицы кроликов на 21 % — до  $267 \pm 17$  мкм. Важно отметить, что прекращение инстилляций препарата с 30 минуты способствовало снижению его дегидратационного эффекта, что выражалось в незначительном (8 %) восстановлении дооперационной толщины роговицы с 40-й минуты эксперимента (рис. 4).

Результаты испытаний растворов Риболинк и изоосмотического Рибофлавина показали их одинаковое действие на строму в течение 60 минут наблюдений. При этом роговица сохраняла свои исходные параметры, как при инстилляциях продолжительностью 60 минут (рис. 5), так и при закапываниях в течение 30 минут.

Эффект применения раствора Гиполинк был связан с развитием характерного отека роговицы. Однако незначительное изменение динамики толщины

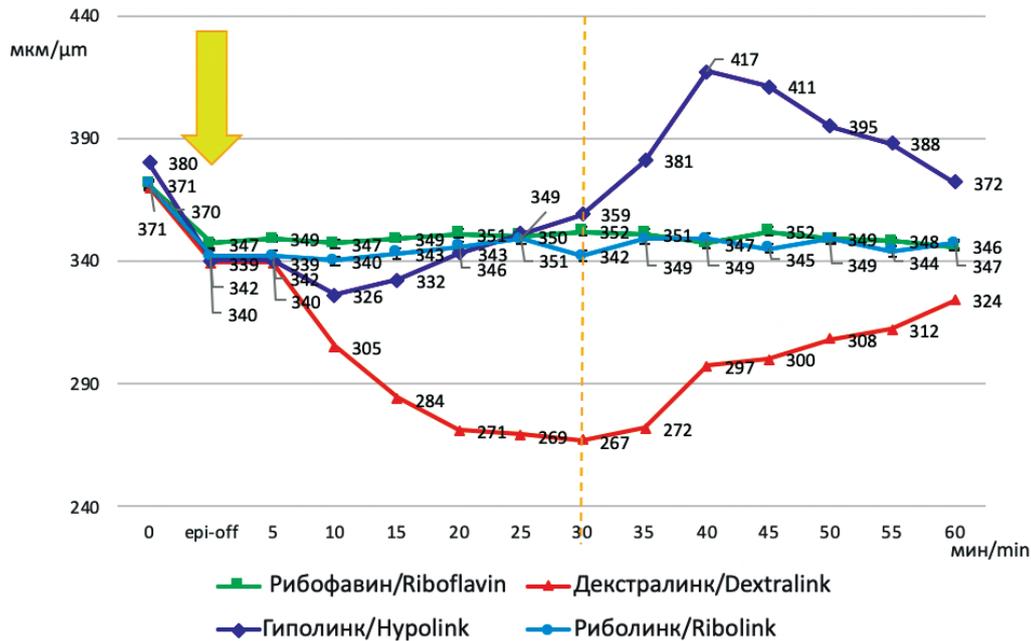
роговицы к 50—60 минуте наблюдений в условиях прекращения инстилляций ФС можно охарактеризовать как невыраженную тенденцию к нормализации дооперационной толщины роговицы, что, несомненно, нужно учитывать в условиях клинического использования гипоосмотических растворов (рис. 5).

Проведенные нами исследования динамики состояния роговицы при инстилляциях растворов ФС в течение 60 минут показали, что применение средства Декстралинк способствовало достоверному снижению корнеальной толщины примерно на 24 % *ex vivo* и на 21 % *in vivo*, Гиполинк — напротив, вызывал ее увеличение на 9 % *ex vivo* и на 23 % *in vivo*, а Риболинк и Рибофлавин практически не изменяли линейные параметры роговой оболочки в течение всего срока наблюдения.

При этом следует отметить, что продолжающиеся закапывания растворов в период с 30 по 60 ми-

нуты, которые соответствуют этапу УФ облучения, создают на поверхности роговицы прекорнеальную

пленку, способную дополнительно поглощать энергию УФ излучения.



**Рис. 5.** Динамика изменений толщины роговиц кроликов *in vivo* в центральной зоне при инстилляциях растворов фотосенсибилизатора (Рибофлавин, Декстралинк, Гиполинк, Риболинк) для УФ кросслинкинга в течение 30 минут. По оси абсцисс — период наблюдений (мин), по оси ординат — толщина роговицы (мкм). Стрелкой отмечен этап деэпителизации (Epi-Off)

**Fig. 5.** Dynamics of changes in the corneal thickness of rabbits *in vivo* in the Central zone during instillation of photosensitizer solutions (Riboflavin, Dextralink, Hypolink, Ribolink) for UV crosslinking for 30 minutes. The abscissa shows the observation period (min), y-axis — thickness of cornea (μm). The arrow marks the stage of de-epithelization (Epi-Off)

Результаты второй серии экспериментов *ex vivo* и *in vivo* при 30-минутных инстилляциях растворов Декстралинк и Гиполинк для УФ кросслинкинга свидетельствуют о том, что их действие на роговицу в целом сохранялось с 30 по 60 минуты наблюдений, хотя и с незначительной тенденцией к восстановлению исходных значений показателя.

Препараты с декстраном способны оказывать дезинтоксикационное действие. Выявлен их антигипоксический эффект, что особенно важно в условиях дефицита кислорода в тканях роговицы в процессе ее УФ облучения при CXL [9—11]. Однако при

использовании средств с рибофлавин-декстраном (Декстралинк) следует учитывать уменьшение влагосодержания стромы, вызванное дегидратирующим влиянием полимера. Выраженное противоотечное действие последнего сопровождается снижением толщины роговицы, что особенно важно при выполнении стандартного CXL с деэпителизацией [12—14]. Таким образом, целесообразно ограничить использование раствора Декстралинк у пациентов с толщиной роговицы менее 450 мкм с тем, чтобы не допустить проникновения цитотоксичной дозы ультрафиолета до эндотелиального слоя.

Раствор Риболинк обеспечивает достаточное проникновение ФС в строму и поддерживает стабильное состояние толщины роговицы в течение всей процедуры СХЛ (60 минут). Это дает возможность применения средства Риболинк у пациентов с толщиной роговицы от 400 мкм. Раствор Рибофлавина по своему влиянию на корнеальную толщину при инстилляциях идентичен Риболинку.

Незначительное количество ГПМЦ, введенное в состав средства Гиполинк, обеспечивает стабилизацию пленки на поверхности роговицы, способствуя компенсации негативного воздействия УФ излучения на внутриглазные структуры. Вероятно, не столь существенный гипоосмотический медикаментозный отек стромы в эксперименте *ex vivo* связан с тем, что роговица глаза животного быстро отекает после энуклеации, т.е. еще до начала инстилляций и биометрических измерений. В исследованиях *in vivo* раствор Гиполинк способствует более выраженному увеличению толщины роговицы за счет ее естественного набухания. Следует отметить, что прижизненные исследования в отличие от экспериментов *ex vivo* позволяют дать более объективную оценку изменений толщины роговицы с учетом сохраняющейся физиологичной глазной гидродинамики. Отек стромы и увеличение корнеальной толщины, вызванные гипоосмотическим эффектом раствора Гиполинк, делают возможным выполнение УФ кросслинкинга у пациентов с экстремально тонкой роговицей — от 350 до 400 мкм.

### Выводы

Безопасное и эффективное выполнение УФ кросслинкинга роговицы возможно на основе рационального подхода к выполнению этапов насыщения стромы растворами ФС в зависимости от исходного состояния роговицы: средство Декстралинк рекомендовано при толщине более 450 мкм, Риболинк — 400—450 мкм. Так называемый эффект «искусственного отека» роговицы позволяет предложить раствор Гиполинк для применения в клинической практике у пациентов с роговицей от 350 до 400 мкм.

Прекращение инстилляций растворов ФС на насыщенную рибофлавином строму в период УФ облучения целесообразно сопровождать интраоперационным контролем толщины роговицы, в особенности при

использовании средств Декстралинк и Гиполинк, значимо влияющих на биометрические параметры роговой оболочки.

Динамика изменений корнеальной толщины при выполнении СХЛ с растворами Гиполинк или Декстралинк в условиях прекращения их инстилляций с 30 по 60 минуту характеризуется тенденцией к частичному восстановлению дооперационных параметров роговицы.

При выполнении стандартной техники кросслинкинга, где этап УФ облучения роговицы сопровождается инстилляциями раствора фотосенсибилизатора, необходимо учитывать наличие прекорнеальной пленки, способной поглощать часть энергии излучения в слоях стромы, что можно рассматривать в качестве потенциального способа защиты интраокулярных тканей от избыточного воздействия УФ излучения, в частности, при разработке оригинального клинического протокола сшивания тонких роговиц.

### Библиографический список

1. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M. Keratocyte Apoptosis after Corneal Collagen Crosslinking Using Riboflavin UVA Treatment // *Cornea*. 2004. Vol. 23. P. 43-49. doi: 10.1097/00003226-200401000-00008.
2. Arnal E., Peris-Martinez C., Menezo J.L. et al. Oxidative stress in keratoconus? // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2011. V. 52. N 12. P. 8592-8597. doi: 10.1167/iov.11-7732
3. Kohlhaas M., Spoerl E., Schilde T. et al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light // *J. Cataract. Refract. Surg*. 2006. V. 32. P. 279-283. doi: 10.1016/j.jcrs.2005.12.092
4. Халимов А.Р. Прекорнеальная пленка рибофлавина в системе ультрафиолетового кросслинкинга роговицы. *Ex vivo* исследование. Медицинский вестник Башкортостана. 2017. Т. 12. № 1. С. 65-67.
5. Халимов А.Р. Молекулярные и клеточные механизмы ультрафиолетового сшивания роговицы: дис. ... д-ра биол. наук. Уфа. 2019. 275 с.
6. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. Офтальмологическое средство для кросслинкинга. Патент РФ изобретение № 2412707/ <https://findpatent.ru/patent/241/2412707.html>. 27.02.2011. Дата обращения: 21.10.2009.
7. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. и др. Офтальмологическое средство для ультрафиолетового кросслинкинга роговицы (Риболинк). Патент РФ изобретение № 2646452 / 07.11.2016. <https://findpatent.ru/patent/264/2646452.html>. Дата обращения: 12.03.2012.
8. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Бикбова Г.М. и др. Гипоосмотическое офтальмологическое средство для ультрафиолетового кросслинкинга тонких роговиц Патент РФ на изобретение № 2631604 от 07.11.2016. <https://findpatent.ru/patent/263/2631604>. Дата обращения: 12.03.2012.

9. Kymionis G.D., Kymionis M.A., Grentzelos Plaka A.D. Correlation of the Corneal Collagen Cross-Linking Demarcation Line Using Confocal Microscopy and Anterior Segment Optical Coherence Tomography in Keratoconic Patients // *Am. J. Ophthalmol.* 2014. Vol. 157. N 1. P. 110-115. doi: 10.1016/j.ajo.2013.09.010
10. Халимов А.Р., Шевчук Н.Е., Суркова В.К. Декстран и его значение в офтальмологическом растворе рибофлавина для ультрафиолетового кросслинкинга роговичного коллагена // *Сб. научн. труд.* 2019. Т. 1. С. 201-205.
11. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Халимов А.Р. Динамика уровня рибофлавина во влаге передней камеры глаза экспериментальных животных при стандартном насыщении стромы растворами для УФ кросслинкинга роговицы // *Вестник офтальмологии*. 2016. Т. 132. N 6. С. 29-35.
12. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение). М.: «Офтальмология», 2011. 164 с.
13. Bueno J.M., Gualda E.J., Giakoumaki A. et al. Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. N 8. P. 5325-5331. doi:10.1167/iovs.11-7184
14. Kling S., Remon L., Perez-Escudero A., et al. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. N 8. P. 3961-3968. doi:10.1167/iovs.09-4536
15. Mencucci R., Marini M., Paladini I. Effects of riboflavin / UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea // *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2010. Vol. 38. N 1. P. 49-56. doi:10.1111/j.1442-9071.2010.02207.x
5. Khalimov AR. Molecular and cellular mechanisms of UV corneal crosslinking. PhD Thesis. Ufa. 2019. 275 p. (In Russ).
6. Bikbov MM, Khalimov AR, Bikbova GM. Ophthalmological agent for cross-linking. Patent RUS №2412707 / 27.02.2011. <https://findpatent.ru/patent/241/2412707.html> (In Russ).
7. Bikbov MM, Halimov AR, Bikbova GM, Kazakbaev RA, Usubov EL, Kazakbaeva GM, Halimova LI. Ophthalmological agent for UV corneal crosslinking (Ribolink). Patent RUS №2646452 / 07.11.2016. <https://findpatent.ru/patent/264/2646452.html> (In Russ).
8. Bikbov MM, Khalimov AR, Bikbova GM, Usubov EL, Kazakbaeva GM, Halimova LI, Kazakbaev RA. Hypoosmotic ophthalmological agent for ultraviolet crosslinking of thin corneas. Patent RUS № 2631604 dated 07.11.2016. <https://findpatent.ru/patent/263/2631604.html> (In Russ).
9. Kymionis GD, Kymionis MA, Grentzelos Plaka AD. Correlation of the Corneal Collagen Cross-Linking Demarcation Line Using Confocal Microscopy and Anterior Segment Optical Coherence Tomography in Keratoconic Patients. *Am. J. Ophthalmol.* 2014;157(1):110-115. doi:10.1016/j.ajo.2013.09.010
10. Khalimov AR, Shevchuk NE, Surkova VK. Dextran and its significance in the ophthalmological solution of Riboflavin for ultraviolet crosslinking of corneal collagen. *St. P. nauchnii trudy.* 2019;1: 201-205. (In Russ).
11. Bikbov MM, Shevchuk NE, Khalimov AR. Dynamics of Riboflavin level in the moisture of the anterior chamber of the eye of experimental animals at standard saturation of the stroma with solutions for UV corneal crosslinking. *Vestnik ophthalmologii.* 2016;132(6):29-35. (In Russ).
12. Bikbov MM, Bikbova GM. *Corneal Ectasia (pathogenesis, pathomorphology, clinics, diagnosis, treatment)*. Moscow. Ophthalmology. 2011. 168 p. (In Russ).
13. Bueno JM, Gualda EJ, Giakoumaki A. et al. Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(8):5325-5331. doi:10.1167/iovs.11-7184
14. Kling S, Remon L, Perez-Escudero A, et al. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51(8):3961-3968. doi:10.1167/iovs.09-4536
15. Mencucci R, Marini M, Paladini I. Effects of riboflavin / UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2010;38(1):49-56. doi:10.1111/j.1442-9071.2010.02207.x

## References

1. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M. Keratocyte Apoptosis after Corneal Collagen Crosslinking Using Riboflavin UVA Treatment. *Cornea*. 2004;23: 43-49. doi:10.1097/00003226-200401000-00008.
2. Arnal E, Peris-Martinez C, Menezo JL et al. Oxidative stress in keratoconus? *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2011;52(12):8592-8597. doi:10.1167/iovs.11-7732
3. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T. et al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J. Cataract. Refract. Surg.* 2006; 32: 279-283. doi:10.1016/j.jcrs.2005.12.092
4. Khalimov AR. Precorneal film of Riboflavin in the corneal UV crosslinking system. Ex vivo research. *Medicinskii vestnik Bashkortostana*. 2017;2(1): 65-67. (In Russ).

*Ответственный за переписку:* Казакбаева Гюлли Мухаррамовна — научный сотрудник отделения медицинской и офтальмологической эпидемиологии ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», Российская Федерация, 450008, г. Уфа, ул. Пушкина, д. 90; E-mail: [gyulli.kazakbaeva@gmail.com](mailto:gyulli.kazakbaeva@gmail.com)

Бикбов М.М. SPIN: 4951-4615; ORCID: 0000-0002-0569-1264  
 Халимов А.Р. SPIN: 7507-4450; ORCID: 0000-0001-7470-73330  
 Суркова В.К. SPIN: 5244-1241; ORCID: 0000-0003-4964-263X  
 Казакбаева Г.М. SPIN: 6256-1989; ORCID: 0000-0002-0569-1264

*Corresponding author:* Gyulli M. Kazakbaeva — research scientist, Ufa Eye Research Institute, 450008, Pushkin str., 90, Ufa, Russia. E-mail: [gyulli.kazakbaeva@gmail.com](mailto:gyulli.kazakbaeva@gmail.com)

Bikbov M. M. ORCID: 0000-0002-0569-1264  
 Khalimov A. R. ORCID: 0000-0001-7470-73330  
 Surkova V. K. ORCID: 0000-0003-4964-263X  
 Kazakbaeva G.M. ORCID: 0000-0002-0569-1264



## КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ CLINICAL PHYSIOLOGY

DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-106-113

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ  
REVIEW

УДК 617.736

### Особенности ангиогенеза при заболеваниях глаз

**Т.А. Халимов**

Уфимский НИИ глазных болезней, г. Уфа, Российская Федерация  
[khalimoff.timur@yandex.ru](mailto:khalimoff.timur@yandex.ru)

**Аннотация.** На основе анализа литературных данных в обзоре изложены сведения о роли и механизмах ангиогенеза в развитии глазных заболеваний. Показано, что к появлению новообразованных сосудов в аваскулярной роговице практически всегда приводит развивающийся воспалительный процесс, связанный с инфекциями или повреждениями органа зрения. Прогрессирование, в частности, возрастной дегенерации макулы связано с иммуноопосредованным развитием процессов ангиогенеза. Ключевым индуктором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), усиление активности которого может осуществляться рядом провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли альфа, TNF- $\alpha$ ), ростовых (фактор роста фибробластов, FGF) и трансформирующих факторов (трансформирующий фактор роста бета, TGF- $\beta$ ). Кроме этого гиперпродукция VEGF опосредована дисбалансом проангиогенных (ангиогенин) и антиангиогенных (ангиостатин, вазостатин, эндостатин; тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ) факторов. Антиангиогенная активность, базирующаяся на ингибировании фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), стала успешно использоваться в лечении ряда глазных заболеваний, таких как экссудативная возрастная макулярная дегенерация и диабетический макулярный отек, в основе патогенеза которых лежит рост новообразованных сосудов. В обзоре представлены сведения об основных антиангиогенных препаратах для интравитреального введения, применяемых в офтальмологии.

**Ключевые слова:** сетчатка, стекловидное тело, неоваскуляризация, факторы ангиогенеза, ингибиторы ангиогенеза, возрастная макулярная дегенерация, ВМД

**Вклад авторов:** концепция написания и дизайн обзора, подготовка текста статьи, оформление и редактирование выполнены единственным автором.

**Информация о конфликте интересов.** Автор данной статьи подтвердил отсутствие конфликта интересов.

**Финансирование.** Финансовое обеспечение работы осуществлено ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан».

© Халимов Т.А., 2021



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

**Благодарности.** Автор выражает большую благодарность директору ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан», докт. мед. наук, профессору Бикбову М.М. за консультирование в процессе подготовки данной работы.

Поступила 19.10.2020. Принята 11.12.2020.

**Для цитирования:** *Халимов Т.А.* Особенности ангиогенеза при заболеваниях глаз // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 106—113. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-106-113

---

## Features of angiogenesis in eye diseases

T.A. Khalimov

Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russian Federation

Corresponding author: khalimoff.timur@yandex.ru

**Annotation.** Based on the analysis of published data, the review provides information on the role and mechanisms of angiogenesis in the development of eye diseases. It has been shown that the developing inflammatory process associated with infections or damage to the organ of vision almost always leads to the appearance of newly formed vessels in the avascular cornea. The progression, in particular, of age-related macular degeneration is associated with the immune-mediated development of angiogenesis processes. A key inducer of angiogenesis is vascular endothelial growth factor (VEGF), whose activity can be enhanced by a number of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ), growth (fibroblast growth factor, FGF) and transforming factors (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ). In addition, VEGF overproduction is mediated by an imbalance of pro-angiogenic (angiogenin) and anti-angiogenic (angiostatin, vasostatin, endostatin; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) factors. Antiangiogenic activity based on inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) has been successfully used in the treatment of a number of eye diseases, such as exudative age-related macular degeneration and diabetic macular edema, the pathogenesis of which is based on the growth of newly formed vessels. The review presents information on the main anti-angiogenic drugs for intravitreal administration, used in ophthalmology.

**Key words:** retina, vitreous, neovascularization, angiogenesis factors, angiogenesis inhibitors, age-related macular degeneration, AMD

**Author contributions:** the concept of writing and design of the review, preparation of the text of the article, design and editing were carried out by a single author.

**Conflict of interest statement.** The author of this article has confirmed that there is no conflict of interest or any commercial or financial relationship.

**Financing.** The financial support of the work was provided by the State Budgetary Institution «Ufa Eye Research Institute of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan».

**Acknowledgments.** The author expresses his deep gratitude to the director of the State Budgetary Institution «Ufa Eye Research Institute of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan», PhD, Professor Bikbov M.M. for consulting in the process of preparing this work.

Received 19.10.2020. Accepted 11.12.2020.

**For citation:** Khalimov TA. Features of angiogenesis in eye diseases. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):106—113. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-106-113

Ангиогенез — динамический регуляторный процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани, охватывающий совокупность про- и антиангиогенных факторов, в который вовлечены окружающие ткани. Этот процесс зависит от уровня экспрессии проангиогенных модуляторов и их ингибиторов.

В настоящее время проблема ангиогенеза, связанная с развитием новообразованной сосудистой патологии при заболеваниях глаз, чрезвычайно актуальна. Особенно пристального и всестороннего внимания специалистов требуют достаточно часто встречающиеся неоваскулярные глазные заболевания, такие как влажная форма возрастной макулярной дегенерации (ВМД), диабетический макулярный отек, ретинопатия недоношенных, неоваскулярная глаукома. Известно, что индукция и процесс ангиогенеза очень часто опосредует интенсивный рост интраокулярных опухолей [1—5].

По опубликованным сведениям за 2020 год глобальная распространенность диабетической ретинопатии (ДР), которая является тяжелым сосудистым осложнением сахарного диабета, составляет 7,26 %. В продолжение последнего десятилетия на ДР приходилось примерно 2,6 % случаев слепоты в мире [6]. Распространенность других неоваскулярных глазных заболеваний также очень высока. По данным ВОЗ, возрастная макулодегенерация является одной из главных причин снижения зрения в экономически развитых странах, что связано с повышением продолжительности жизни и увеличением населения старшей возрастной группы. В России доля лиц с ВМД в возрастной группе 65—74 года составляет 15 %, от 75 лет — около 25 %, а старше 85 лет — более 30 % [7]. ВМД стала вторым в мире по значимости заболеванием, приводящим к нарушению зрительных функций и слепоте (8,7 %).

Очень часто прогрессирование возрастной макулярной дегенерации, в особенности не поздних стадиях заболевания, обусловлено процессом ангиогенеза. Формирование и увеличение числа друз при неэкссудативной (сухой) форме ВМД по мере развития болезни запускает воспалительные процессы в сетчатке, опосредованные инфильтрацией макрофагов, факторов комплемента и провоспалительных

цитокинов и хемокинов. При этом вторгающиеся макрофаги обеспечивают мощные проангиогенные сигналы, которые обостряют хориоидальную инвазию сосудов [8]. Имеется достаточно доказательств вовлечения иммунных клеток в неоваскулярную систему при ВМД [9, 10]. В последующем в патодинамический процесс включается фактор роста эндотелия сосудов, стимулирующий патологический рост новообразованных сосудов. На этом этапе сухая форма ВМД переходит во влажную. Установлено, что у пациентов с поздней стадией неэкссудативной формы ВМД в течение 5 лет примерно в 20 % случаев могут появиться признаки неоваскулярных изменений [11].

Одним из ключевых стимуляторов васкулогенеза и ангиогенеза, которому отводится особая роль в неоваскулярной патологии, является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF), принадлежащий к семейству пептидных соединений. Его изоформы, в частности, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, отличаются количеством аминокислот. VEGF-A, который также именуют как VEGF, изначально был описан как фактор сосудистой проницаемости. Это высокоспецифичный сигнальный белок, мощный митоген клеток сосудистого эндотелия, не вызывающий пролиферацию других типов клеток, который способствует образованию новых сосудов, в особенности после эпизодов ишемии. Показано, что VEGF стимулирует выживаемость эндотелиальных клеток, подавляя их апоптоз [12]. Следует отметить, что VEGF-опосредованный ангиогенез носит как физиологический, так и патологический характер [13]. VEGF-A, VEGF-B и плацентарный фактор роста (placental growth factor — PlGF) являются главными медиаторами ангиогенеза. Другие факторы — VEGF-C и VEGF-D — способны регулировать формирование лимфатических сосудов [12, 14].

Экспрессируется VEGF в эндотелиальных клетках хориоидеи и сетчатки, клетках пигментного эпителия, глиальных клетках, клетках Руже и клетках Мюллера [15].

Фактор роста эндотелия сосудов активирует протеиназы, участвующие в деградации экстрацеллюлярного матрикса. Так, VEGF способен инду-

цировать экспрессию ингибиторов и активаторов матричных металлопротеиназ (ММП), таких как коллагеназы и желатиназы А [16]. Проангиогенные факторы, в особенности VEGF, оказывают протекторное действие по отношению к нейронам, в частности при травматических повреждениях. Показано, что недостаточный уровень VEGF может привести к развитию нейродегенеративных процессов [17].

Активация VEGF происходит в результате его взаимодействия с рецептором, что приводит к запуску генетической программы ангиогенеза посредством индукции каскада вторичных сигнальных молекул, активирующих факторы транскрипции. Следует отметить, что активация VEGF, как правило, сопровождается вовлечением дополнительных ангиогенных факторов [18]. Продукцию VEGF усиливают ряд провоспалительных цитокинов и факторов роста, которые опосредованно оказывают проангиогенное действие: трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor — TGF-β); фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor — FGF); тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor — PDGF); фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor — CTGF); фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor — TNF-α); а также интерлейкин-8, ангиогенин, пролиферин и некоторые другие биологически активные молекулы [19, 20].

Основной фактор роста фибробластов (bFGF) способен действовать как неспецифический активатор клеточной пролиферации, влияя на миграцию и дифференциацию клеток при различных физиологических и патологических процессах, как в период эмбрионального развития, так и в зрелом организме. bFGF продуцируется преимущественно активированными клетками эндотелия, макрофагами или фибробластами [21]. VEGF и bFGF проявляют синергизм в ангиогенезе, при этом последний стимулирует экспрессию VEGF и его клеточных рецепторов [22]. Установлено, что VEGF-индуцируемая коллагеназная активность может вызывать дополнительное высвобождение bFGF [23]. Последний позиционируется как один из основных патогенетических агентов развития пролифера-

тивной диабетической ретинопатии и ряда других процессов неоваскуляризации [24].

Еще одним ключевым фактором ангиогенеза является полипептид ангиогенин (*angiogenin* — ANG), который продуцируется, в частности, эндотелиоцитами, фибробластами, лимфоцитами. Являясь мощным стимулятором роста сосудов, ангиогенин обладает собственной ферментативной активностью [25].

Одним из маркеров повреждения сосудистого русла является также моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (monocyte chemoattractant protein — MCP-1), который относится к семейству хемотаксических цитокинов, способствующих миграции лейкоцитов в зону воспаления. Экспрессия гена MCP-1 повышается под воздействием интерлейкина-1, фактора некроза опухоли-α, тромбоцитарного фактора роста. Кроме этого, индуцировать экспрессию MCP-1 могут гипоксические состояния [26].

Дисбаланс про- и антиангиогенных факторов, вызванных гиперпродукцией VEGF, индуцирует механизм формирования новообразованных сосудов, включающих, в частности, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, активацию синтеза матричных металлопротеиназ, необходимых для инвазии новообразованных сосудов в окружающие ткани [27]. Казалось бы, неоваскуляризация призвана улучшать кровоснабжение ишемизированных структур и улучшать состояние органов и систем организма. Однако новообразованные сосуды, в частности, сетчатки, физиологически несостоятельны, их проницаемость приводит к тому, что содержимое кровеносного русла просачивается в окружающие ткани. При этом разрастание сосудов, как правило, не ограничивается сетчаткой и наблюдается в стекловидном теле, что в результате приводит к нарушению функции хориоидеи, витреальным гемофтальмам, ретинальной транссудации, экссудации и геморрагиям. Провоспалительные цитокины и факторы роста, проникающие вместе с плазмой крови, индуцируют фиброзирование тканей заднего отрезка глаза, образование субретинальных мембран, тракций и отслойку сетчатки [28, 29]. Такое патологическое развитие событий клинически проявляется значительным прогрессирующим снижением зрительных функций вплоть до слепоты [30, 31].

К появлению новообразованных сосудов в роговице практически всегда приводит развивающийся воспалительный процесс, связанный с инфекциями, травмами или ожогами органа зрения. Ангиогенез характерен, как правило, для кератитов различной этиологии, в особенности на поздних стадиях заболевания. Показано что гипоксия роговицы, вызванная длительным и бесконтрольным ношением контактных линз с низкой кислородной проницаемостью, также может быть причиной развития сосудистой инвазии в слои роговой оболочки [32].

Действие индукторов ангиогенеза в организме лимитируется антиангиогенными факторами, пептидами, цитокинами и гормонами. К настоящему времени описано около пятидесяти эндогенных веществ с выраженными противоангиогенными свойствами, среди которых наиболее изучены: ангиостатин, вазостатин, эндостатин; тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП-1,—2); фактор пигментного эпителия (pigment epithelial derived factor — PEDF); тромбоцитарный фактор 4 (platelet factor 4 — PF4); интерлейкин-12,—18 и ряд других [21, 33, 34]. Продукция ингибиторов ангиогенеза рассматривается как защитный механизм, предупреждающий неконтролируемую неоваскуляризацию.

Ангиостатин и эндостатин относятся к наиболее специфичным ингибиторам ангиогенеза, действующим на пролиферирующие эндотелиальные клетки [21]. Выявлено противоангиогенное действие эндостатина, которое основано на стимуляции апоптоза посредством изменения соотношения анти- (Vcl-2, Vcl-XL) и проапоптозных (BAX) белков в пролиферирующих эндотелиальных клетках патологически растущих сосудов. Рост эндотелиальных клеток сосудов ингибирует также и ангиостатин [35, 36].

Все антиангиогенные факторы в той или иной степени подавляют адгезию, миграцию или пролиферацию клеток сосудистого эндотелия. Механизмы их генерации во многом остаются неясными. Установлено, что одну из ведущих ролей в процессе ангиогенеза играет система свертывания крови. Так было показано, что тромбоцитами секретируются как индукторы, так и различные ингибиторы ангиогенеза (тромбоцитарный фактор 4, тромбоспон-

дин 1 и др.), которые также могут образовываться на различных этапах каскада свертывания крови [37].

Антиангиогенная активность, базирующаяся на ингибировании VEGF, стала успешно использоваться в лечении ряда глазных заболеваний, в частности, экссудативной возрастной макулярной дегенерации и диабетического макулярного отека, в основе патогенеза которых лежит рост новообразованных сосудов. Так, выделенные моноклональные антитела, способные селективно связываться и ингибировать биологическую активность VEGF, нашли свое применение в используемых в настоящее время лекарственных средствах [38—40]. Первым одобренным анти-VEGF препаратом для лечения влажной формы ВМД был Пегаптаниб (Pegaptanib), способствующий блокированию специфической изоформы VEGF-A. Другим анти-VEGF средством, которое применяется в онкологической практике для снижения васкуляризации и подавления роста новообразований, является Бевацизумаб (Bevacizumab, Avastin), представляющее собой рекомбинантные моноклональные IgG1 антитела к VEGF. Имеются сведения о непродолжительном использовании последнего для лечения ВМД. В настоящее время Российской Федерации разрешены к применению два препарата: Ранибизумаб (Ranibizumab) и Афлиберцепт (Aflibercept, Eylea). Первый из них обладает высокой аффинностью к VEGF и способностью проникать до всех слоев сетчатки после интравитреального введения, второй (Афлиберцепт) — блокирует изоформы VEGF-A и VEGF-B, является гибридным рекомбинантным белком, состоящим из VEGF-связывающих доменов рецептора VEGFR-1 и VEGFR-2, соединенных с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина G1.

## Выводы

Несмотря на достигнутый прогресс в области регуляции неоваскуляризации в офтальмологии, проведенный анализ литературных данных позволяет выделить значимую роль проангиогенных факторов в развитии сосудистой патологии органа зрения, а проблему ангиогенеза глазных заболеваний, безусловно, признать весьма актуальной и до конца не изученной сферой научных экспериментально-клинических исследований.

## Библиографический список

1. Stitt A.W., Simpson D.A., Boockch C., Gardiner T.A., Murphy G.M., Archer D.B. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumours // *J. Pathol.* 1998. Vol. 186. N 3. P. 306–312. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<306::AID-PATH183>3.0.CO;2-B
2. Бикбов М.М., Файзрахманов Р.Р., Ярмухаметова А.Л. Возрастная макулярная дегенерация. М.: Апрель, 2013.
3. Михайличенко В.Ю., Иващенко А.С. Патогизиология VEGF при тромбозе вен сетчатки глаза и антиангиогенная терапия // *Kharkiv surgical school*. 2014. Т. 5. № 68. С. 65–69.
4. Bikbov M., Gilmanshin T., Zainullin R., Kazakbaeva G., Rakhimova E., Safullina K., Panda-Jonas S., Rusakova Iu., Bolshakova N., Bikbova G., Jonas J.B. Prevalence and associated factors of diabetic retinopathy in a Russian Population. The Ural Eye and Medical Study // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019. Vol. 60. N 9. P. 3959.
5. Bikbov M., Zainullin R., Gilmanshin T., Kazakbaeva G., Rakhimova E., Rusakova Yu., Bolshakova N., Safullina K., Yakupova D., Uziyanbaeva Yu., Khalimov T., Salavatova V., Panda-Jonas S., Arslangareeva I., Nuriev I., Bikbova G., Zaynetdinov A., Zinnatullin A., Jonas J.B. Prevalence and associated factors of age-related macular degeneration in a Russian population: The Ural Eye and Medical Study // *Am. Journal of Ophthalmology*. 2020. Vol. 210. P. 146–157. doi: 10.1016/j.ajo.2019.10.004
6. Teo Z., Tham Y., Yu M., Cheng Ch., Wong T., Sabanayagam C. Do we have enough ophthalmologists to manage vision-threatening diabetic retinopathy? A global perspective. *Eye (Lond)*. 2020. Vol. 34. N 7. P. 1255–1261. doi: 10.1038/s41433-020-0776-5
7. Klein R., Peto T., Bird A., Vannewkirk M. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 2004. Vol. 137. N 3. P. 486–495. doi: 10.1016/j.ajo.2003.11.069
8. Killingsworth M.C., Sarks J.P., Sarks S.H. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration // *Eye (Lond)*. 1990. Vol. 4. N Pt 4. P. 613–621. doi: 10.1038/eye.1990.86
9. Sarks J.P., Sarks S.H., Killingsworth M.C. Morphology of early choroidal neovascularisation in age-related macular degeneration: correlation with activity // *Eye (Lond)*. 1997. Vol. 11. N (Pt 4). P. 515–522. doi: 10.1038/eye.1997.137
10. Oh H., Takagi H., Takagi C., Suzuma K., Otani A., Ishida K., Matsumura M., Ogura Y., Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999. Vol. 40. N 9. P. 1891–1898.
11. Ehrlich R., Harris A., Kheradiya N.S., Winston D.M., Ciulla T.A., Wirostko B. Age-related macular degeneration and the aging eye // *Clin. Interv. Aging*. 2008. Vol. 3. N 3. P. 473–482. doi: 10.2147/cia.s2777
12. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза // *Вестник РАМН*. 2012. № 2. С. 23–34.
13. Connolly D., Heivelman D., Nelson R., Olander J., Eppley B., Delfino J., Siegel N., Leimgruber R., Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis // *Journal of Clinical Investigation*. 1989. Vol. 84. N 5. P. 1470–1478. doi: 10.1172/JCI114322
14. Miletic H., Niclou S.P., Johansson M., Bjerkvig R. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms // *Expert Opin Ther Targets*. 2009. Vol. 13. N 4. P. 455–468. doi: 10.1517/14728220902806444
15. Steele F.R., Chader G.J., Johnson L.V., Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. Vol. 90. N 4. P. 1526–1530. doi: 10.1073/pnas.90.4.1526.
16. Folkman J. Angiogenesis // *Annu. Rev. Med.* 2006. Vol. 57. P. 1–18. doi: 10.1146/annurev.med.57.121304.131306
17. Greenberg D., Jin K. From angiogenesis to neuropathology // *Nature*. 2005. Vol. 438. N 7070. P. 954–959. doi: 10.1038/nature04481
18. Rosen L.S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers // *Cancer Control*. 2002. Vol. 9. N 2Suppl. P. 36–44. doi: 10.1177/107327480200902S05
19. Witmer A.N., Vrensen G.F., Van Noorden C.J., Schlingemann R.O. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease // *Prog Retin Eye Res*. 2003. Vol. 22. N 1. P. 1–29. doi: 10.1016/s1350-9462(02)00043-5
20. Spilbury K., Garrett K.L., Shen W.Y., Constable I.J., Rakoczy P.E. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization // *Am. J. Pathol.* 2000. Vol. 157. N 1. P. 135–144. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64525-7
21. Исакакова С.С., Жармаханова Г.М., Дворацка М. Характеристика проангиогенных факторов и их патогенетическая роль // *Наука и здравоохранение*. 2013. № 6. С. 8–12.
22. Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis // *J. Wound Care*. 2009. Vol. 18. N 12. P. 516–519. doi: 10.12968/jowc.2009.18.12.45609
23. Шурыгин М.Г., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Мачхин И.Н. Основные активаторы ангиогенеза и их применение в кардиологии // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2005. № 6 (44). С. 199–207.
24. Подгребельный А.Н., Смирнова О.М., Дедов И.И., Ильин А.В., Никанкина Л.В., Котельников М.В. и др. Атеросклероз и факторы роста у пациентов с сахарным диабетом типа 2 // *Сахарный диабет*. 2005. № 1. С. 26–29.
25. Гуляев А.Е., Лохвицкий С.В., Тусупханов Б.А. Ранозаживляющие эффекты рекомбинантного ангиогенина человека // *Медицина и экология*. 2010. № 3. С. 9–12.
26. Батюшин М.М., Гадаборшева Х.З. Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1: роль в развитии тубулоинтерстициального фиброза при нефропатиях // *Медицинский вестник северного Кавказа*. 2017. Т. 12. № 2. С. 234–239.
27. Малиновская И.И. Ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов в лечении диабетического макулярного отека // *Новости хирургии*. 2011. Т. 19. № 3. С. 118–125.
28. Качалина Г.Ф., Дога А.В., Касмынина Т.А., Куранова О.И. Эпиретинальный фиброз: патогенез, исходы, способы лечения // *Офтальмохирургия*. 2013. № 4. С. 108–110.
29. Халимов Т.А., Ахтямов К.Н., Габсаликова Р.Т., Сарваров Д.А. К вопросу патогенеза эпиретинальных мембран // *Точка зрения. Восток-Запад*. 2018. № 2. С. 116–118. doi: 10.25276/2410-1257-2018-2-116-118
30. Тихонович М.В., Иойлева Е.Э. Роль эндотелиального фактора роста сосудов в физиологии сетчатки // *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2015. № 12 (187). С. 244–249.

31. Бикбов М.М., Зайнуллин Р.М., Гильманшин Т.Р., Халимов Т.А. Сравнительный анализ отдаленных результатов хирургического лечения диабетического макулярногo отека и эпиретинальной мембраны // Офтальмология. 2019. Т. 16. № S1. С. 33–39. doi: 10.18008/1816-5095-2019-1S-33-39

32. Efron N. Vascular response of the cornea to contact lens wear // J. Am. Optom. Assoc. 1987. Vol. 58. N 10. P. 836–846.

33. Ribatti D., Nico B., Crivellato E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis // *Angiogenesis*. 2009. Vol. 12. N 2. P. 101–111. doi: 10.1007/s10456-008-9125-1

34. Черток В.М., Черток А.Г., Зенкина В.Г. Эндотелиозависимая регуляция ангиогенеза // Цитология. 2017. Т. 59. № 4. С. 243–258.

35. Дигтярь А.В., Позднякова Н.В., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Северин С.Е. Эндостатин: современные представления о его роли и механизмах действия // Биохимия. 2007. Т. 72. № 3. С. 291–305.

36. Javaherian K., Lee T.Y., Tjin Tham Sjin R.M., Parris G.E., Hlatky L. Two endogenous antiangiogenic inhibitors, endostatin and angiostatin, demonstrate biphasic curves in their antitumor profiles // *Dose Response*. 2011. Vol. 9. N 3. P. 369–376. doi: 10.2203/dose-response.10-020.Javaherian

37. Rhim T.Y., Park C.S., Kim E., Kim S.S. Human prothrombin fragment 1 and 2 inhibit bFGF-induced BCE cell growth // *Biochem Biophys Res Commun*. 1998. Vol. 252. N 2. P. 513–516. doi: 10.1006/bbrc.1998.9682

38. Mansour A., Chhablani J., Antonios R., Yogi R., Younis M., Dakroub R., Chahine H. Three-month outcome of ziv-aflibercept for exudative age-related macular degeneration // *Br. J. Ophthalmol*. 2016. Vol. 100. N 12. P. 1629–1633. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-308319

39. Гильманшин Т.Р., Файзрахманов Р.Р., Арслангареева И.И., Халимов Т.А. Локальные пути введения лекарственных препаратов в офтальмологии: преимущества и недостатки (обзор литературы) // Точка зрения. Восток-Запад. 2016. № 3. С. 165–168.

40. Зайнуллин Р.М., Гильманшин Т.Р., Кудоярова К.И., Каланов М.Р., Халимов Т.А., Габсаликова Р.Т. Лечение влажной формы возрастной макулярной дегенерации: возможности и перспективы (обзор литературы) // Точка зрения. Восток-Запад. 2019. № 2. С. 124–128. doi: 10.25276/2410-1257-2019-1-124-128

## References

1. Stitt AW, Simpson DA, Wooscock C, Gardiner TA, Murphy GM, Archer DB. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumours. *J. Pathol*. 1998;186:306-312. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<306::AID-PATH183>3.0.CO;2-B

2. Bikbov MM, Faizrahmanov RR, Yarmukhmetova AL. Age-related macular degeneration. Moscow: April. 2013;196. (In Russ).

3. Mikhailichenko VYu., Ivaschenko AS. VEGF pathophysiology in retinal vein thrombosis and antiangiogenic therapy. *Kharkiv surgical school*. 2014;5(68):65-69. (In Russ).

4. Bikbov M, Gilmanshin T, Zainullin R, Kazakbaeva G, Rakhimova E, Safiullina K, Panda-Jonas S, Rusakova Iu, Bolshakova N, Bikbova G, Jonas JB. Prevalence and associated factors of diabetic retinopathy in a Russian Population. The Ural Eye and Medical Study *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2019;60(9):3959.

5. Bikbov M, Zainullin R, Gilmanshin T, Kazakbaeva G, Rakhimova E, Rusakova Yu, et al. Prevalence and Associated Factors of Age-Related Macular Degeneration in a Russian Population: The Ural Eye and Medical Study. *Am. Journal of Ophthalmology*. 2020;210:146-157. doi: 10.1016/j.ajo.2019.10.004

6. Teo Z, Tham Y, Yu M, Cheng Ch, Wong T, Sabanayagam C. Do we have enough ophthalmologists to manage vision-threatening diabetic retinopathy? A global perspective *Eye (Lond)*. 2020;34(7):1255–1261. doi: 10.1038/s41433-020-0776-5.

7. Klein R, Peto T, Bird A. et al. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol*. 2004;137:486-495. doi: 10.1016/j.ajo.2003.11.069

8. Killingsworth MC, Sarks JP, Sarks SH. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*. 1990;4(Pt4):613-621. doi: 10.1038/eye.1990.86

9. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth MC. Morphology of early choroidal neovascularisation in age-related macular degeneration: correlation with activity. *Eye (Lond)*. 1997;11(Pt 4):515-522. doi: 10.1038/eye.1997.137

10. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1999;40(9):1891-1898.

11. Ehrlich R, Harris A, Kheradiya NS, Winston DM, Ciulla TA, Wirotko B. Age-related macular degeneration and the aging eye. *Clin. Interv. Aging*. 2008;3(3):473-482. doi: 10.2147/cia.s2777

12. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, Gurina OI. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2012;2:23-34. (In Russ).

13. Connolly D, Heivelman D, Nelson R, Olander J, Eppley B, Delfino J, Siegel N, Leimgruber R, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *Journ. of Clinical Investigation*. 1989;84(5):1470-1478. doi: 10.1172/JCI114322

14. Miletic H, Niclou SP, Johansson M, Bjerkvig R. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(4):455-468. doi: 10.1517/14728220902806444

15. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(4):1526-1530. doi: 10.1073/pnas.90.4.1526.

16. Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med*. 2006;57:1-18. doi: 10.1146/annurev.med.57.121304.131306

17. Greenberg D, Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*. 2005;438(7070):954-959. doi: 10.1038/nature04481

18. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002;9(2 Suppl):36-44. doi: 10.1177/107327480200902S05

19. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(1):1-29. doi: 10.1016/s1350-9462(02)00043-5

20. Spilisbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol*. 2000;157:135-144. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64525-7

21. Iskakova S, Zharmakhanova G, Dworacka M. Characterization of proangiogenic factors and their pathogenetic role (review). *Science and healthcare*. 2013;6:8-12. (In Russ).
22. Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J. Wound Care*. 2009;18(12):516-519. doi: 10.12968/jowc.2009.18.12.45609
23. Shurygin MG, Dremina NN, Shurygina IA, Machkhin IN. The main activators of angiogenesis and their use in cardiology. *Annals of the Eastern Siberian Scientific Center of the Siberian Department of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2005;6(44):199-207. (In Russ).
24. Podgrebelny AN, Smirnova OM, Dedov I., Ilyin AV, Nikankina LV. et al. Atherosclerosis and growth factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes mellitus* 2005;1:26-29. (In Russ).
25. Gulyayev AY, Lokhvitski SV, Tusupkhanov BA. Wound healing effects of man's recombined angiogenin. *Medicine and ecology*. 2010;3:9-12. (In Russ).
26. Batiushin MM, Gadaborsheva KhZ. Monocyte chemoattractant protein-1: its role in the development of tubulointerstitial fibrosis in nephropathies. *Medical news of North Caucasus*. 2017;12(2):234-239. (In Russ).
27. Malinovskaya II. Vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of diabetic macular edema. *Surgery news*. 2011;19(3):118-125. (In Russ).
28. Kachalina GF, Doga AV, Kasmynina TA, Kuranova OI. Epiretinal fibrosis: pathogenesis, outcomes, methods of treatment. *Ophthalmosurgery*. 2013;4:108-110. (In Russ).
29. Khalimov TA, Akhtyamov KN, Gabsalikova RT, Sarvarov DA. Pathogenesis epiretinal membranes (literature review). *Point of view. East-West*. 2018;2:116-118. (In Russ). doi:10.25276/2410-1257-2018-2-116-118
30. Tikhonovich MV, Ioyleva EE. The role of vascular endothelial growth factor in the physiology of the retina. *Annals of the Orenburg State University*. 2015;12(187):244-249. (In Russ).
31. Bikbov MM, Zainullin RM, Gilmanshin TR, Khalimov TA. Comparative Analysis of the Long-Term Results of Diabetic Macular Edema and Epiretinal Membrane Surgical Treatment. *Ophthalmology in Russia*. 2019;16(1S):33-39 (In Russ). doi:18008/1816-5095-2019-1S-33-39
32. Efron N. Vascular response of the cornea to contact lens wear. *J. Am. Optom. Assoc*. 1987;58(10):836-846.
33. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12(2):101-111. doi: 10.1007/s10456-008-9125-1
34. Chertok VM, Chertok AG, Zenkina VG. Endotelial-dependent of the regulation of angiogenesis. *Cytology*. 2017; 59(4): 243-258. (In Russ).
35. Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, Lutsenko SV, Severin SE. Endostatin: current concepts about biological role and mechanisms of action. *Biochemistry*. 2007;72(3):291-305. (In Russ).
36. Javaherian K, Lee TY, Tjin Tham Sjin RM, Parris GE, Hlatky L. Two endogenous antiangiogenic inhibitors, endostatin and angiostatin, demonstrate biphasic curves in their antitumor profiles. *Dose Response*. 2011;9(3):369-376. doi: 10.2203/dose-response.10-020. Javaherian
37. Rhim TY, Park CS, Kim E, Kim SS. Human prothrombin fragment 1 and 2 inhibit bFGF-induced BCE cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252(2):513-516. doi: 10.1006/bbrc.1998.9682
38. Mansour A, Chhablani J, Antonios R, Yogi R, Younis M, Dakroub R, Chahine H. Three-month outcome of ziv-aflibercept for exudative age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol*. 2016;100(12):1629–1633. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-308319
39. Gilmanshin TR, Fayzrakhmanov RR, Arslangareeva II, Khalimov TA. Local ways of application of medicines in ophthalmology: advantages and disadvantages (literature review). *Point of view. East-West*. 2016;3:165-168. (In Russ).
40. Zainullin RM, Gilmanshin TR, Kudoyarova KI, Khalimov TA, Gabsalikova RT. Treatment of the wet form of age-related macular degeneration (literature review). *Point of view. East-West*. 2019;2:124-128. (In Russ). doi:10.25276/2410-1257-2019-1-124-128

*Ответственный за переписку:* Халимов Тимур Азатович — врач-офтальмолог 4 микрохирургического отделения ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан». Адрес: Российская Федерация, 450008, г. Уфа, ул. Пушкина, д. 90. E-mail: khalimoff.timur@yandex.ru  
SPIN: 5339–3894; ORCID: 0000–0001–7141–3214

*Corresponding author:* Khalimov Timur Azatovich — ophthalmologist of the 4th microsurgical department of the State Budgetary Institution «Ufa Research Institute of Eye Diseases of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan». Address: 450008, Pushkin st., 90, Ufa, Russia. E-mail: khalimoff.timur@yandex.ru  
ORCID: 0000–0001–7141–3214

DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-114-126

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ  
REVIEW

## Регуляция нейрогенеза и церебрального ангиогенеза продуктами протеолиза клеточных белков

Е.А. Тепляшина\*, Ю.К. Комлева,  
Е.В. Лычковская, А.С. Дейхина, А.Б. Салмина

Красноярский государственный медицинский университет  
имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Российская Федерация  
\* elenateplyashina@mail.ru

**Аннотация.** Развитие головного мозга представляет собой уникальный процесс, характеризующийся механизмами, определяемыми как нейропластичность (синаптогенез, элиминация синапсов, нейрогенез, церебральный ангиогенез). Многие нарушения развития головного мозга, повреждение головного мозга, а также старение проявляются неврологическим дефицитом, в основе которого — абберрантная нейропластичность. Присутствие стволовых и прогениторных клеток в нейрогенных нишах головного мозга обеспечивает образование новых нейронов, способных интегрироваться в предрасположенные синаптические ансамбли. Определяющими факторами для клеток нейрогенной ниши являются активность сосудистого скаффолда и наличие активных регуляторных молекул, формирующих оптимальное микроокружение. Установлено, что внутримембранный регулируемый протеолиз играет важную роль в контроле процессов нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга. Молекулы, генерируемые за счет активности специфических протеаз, могут стимулировать или подавлять активность стволовых и прогениторных клеток, их пролиферацию и дифференцировку, миграцию и интеграцию вновь образованных нейронов в синаптические ансамбли. Локальный неангиогенез поддерживает процессы нейрогенеза в нейрогенных нишах, что гарантируется мультивалентным действием пептидов, формирующихся из трансмембранных белков. Идентификация новых молекул-регуляторов процессов нейропластичности (нейрогенез и ангиогенез) из числа ферментов, субстратов и продуктов внутримембранного протеолиза обеспечит разработку протоколов регистрации процессов нейропластичности и эффективной фармакологической модуляции.

**Ключевые слова:** головной мозг, нейрогенез, церебральный ангиогенез, стволовые клетки, прогениторные клетки, регулируемый внутримембранный протеолиз

**Вклад авторов:** Тепляшина Е.А. — анализ данных литературы по проблематике исследования, редактирование текста; Комлева Ю. К. — разработка дизайна и методологии, проведение исследования и статистический анализ, подготовка текста; Лычковская Е.В. — анализ данных литературы по проблематике исследования; Дейхина А.С. — перевод статьи на английский язык; Салмина А.Б. — разработка концепции, утверждение окончательного варианта статьи.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения РФ (2018—2020 гг.).

© Тепляшина Е.А., Комлева Ю.К., Лычковская Е.В., Дейхина А.С., Салмина А.Б., 2021



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

Поступила 20.01.2021. Принята 11.02.2021.

**Для цитирования:** Тепляшина Е.А., Комлева Ю.К., Лычковская Е.В., Дейхина А.С., Салмина А.Б. Регуляция нейrogenеза и церебрального ангиогенеза продуктами протеолиза клеточных белков // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 114—126. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-114-126

---

## Regulation of neurogenesis and cerebral angiogenesis by cell protein proteolysis products

E.A. Teplyashina\*, Y.K. Komleva,  
E.V. Lychkovskaya, A.S. Deikhina, A.B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

\*Corresponding author: elenateplyashina@mail.ru

**Annotation.** Brain development is a unique process characterized by mechanisms defined as neuroplasticity (synaptogenesis, synapse elimination, neurogenesis, and cerebral angiogenesis). Numerous neurodevelopmental disorders brain damage, and aging are manifested by neurological deficits that are caused by aberrant neuroplasticity. The presence of stem and progenitor cells in neurogenic niches of the brain is responsible for the formation of new neurons capable of integrating into preexisting synaptic assemblies. The determining factors for the cells within the neurogenic niche are the activity of the vascular scaffold and the availability of active regulatory molecules that establish the optimal microenvironment. It has been found that regulated intramembrane proteolysis plays an important role in the control of neurogenesis in brain neurogenic niches. Molecules generated by the activity of specific proteases can stimulate or suppress the activity of neural stem and progenitor cells, their proliferation and differentiation, migration and integration of newly formed neurons into synaptic networks. Local neoangiogenesis supports the processes of neurogenesis in neurogenic niches, which is guaranteed by the multivalent action of peptides formed from transmembrane proteins. Identification of new molecules regulating the neuroplasticity (neurogenesis and angiogenesis). i. e. enzymes, substrates, and products of intramembrane proteolysis, will ensure the development of protocols for detecting the neuroplasticity markers and targets for efficient pharmacological modulation.

**Key words:** brain, neurogenesis, cerebral angiogenesis, stem cell, progenitor cell, regulated intramembrane proteolysis

**Author contributions.** E. A. Teplyashina — analysis of the literature on the subject of research, editing the text; Y.K. Komleva — design and methodology development, research and statistical analysis, text writing; E. V. Lychkovskaya — analysis of the literature on the subject of research; A. S. Deikhina — translation of the article; A.B. Salmina — development of the concept, approval of the final version of the article.

**Conflicts of interest statement.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The work was supported by the state task of the Ministry of Health of the Russian Federation (2018—2020).

Received 20.01.2021. Accepted 11.02.2021.

**For citation:** Teplyashina E.A., Komleva Y.K., Lychkovskaya E.V., Deikhina A.S., Salmina A.B. Regulation of neurogenesis and cerebral angiogenesis by cell protein proteolysis products. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):114—132. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-114-132

## Нейрогенез и пластичность головного мозга

Развитие головного мозга сопряжено с широким спектром клеточных и молекулярных событий, определяющих феномен нейропластичности. Важную роль в пластичности мозга играют стволовые и прогениторные клетки, которые дают начало клеткам нейрональной, астроглиальной и олигодендроглиальной природы. Известно, что стволовые клетки проявляют два основных фундаментальных свойства: 1) самообновление, что необходимо для поддержания пула стволовых клеток, готовых принять сигнал из микроокружения к пролиферации; 2) мультипотентность, при которой стволовая клетка формирует прогениторные клетки, способные дифференцироваться в другие типы клеток. Эти события протекают в пределах клоногенных ниш, формирующих оптимальное микроокружение для выживания и развития стволовых и прогениторных клеток. Концепция, согласно которой стволовые клетки находятся в специализированных нишах, впервые была предложена в 1970-х годах [1], но только в 2000-х годах был достигнут существенный прогресс в описании как клеточных компонентов ниш, так и их функциональных взаимодействий в различных тканях [2].

Нейрогенез у млекопитающих определяется как процесс, который приводит к генерации функциональных нейронов из нейральных стволовых клеток (neural stem cells, NSCs). Этот процесс включает в себя поддержание пула стволовых клеток, вступление их в клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток-потомков стволовых и прогениторных клеток, интеграцию вновь образованных нейронов в предсуществующие синаптические ансамбли [3]. NSCs и клетки-предшественники (neural progenitor cells, NPCs) обладают достаточно высоким регенеративным потенциалом, так как способны дифференцироваться в три типа клеток ЦНС — нейроны, астроциты и олигодендроциты, будучи, однако, весьма уязвимой популяцией клеток при патологии головного мозга и при физиологическом старении [4—6].

В период эмбрионального развития млекопитающих нервная трубка состоит из одного слоя нейро-

эпителиальных клеток, которые могут подвергаться делению. В эмбриональном нейрогенезе нейроэпителиальные клетки могут следовать симметричному делению, формируя две дочерние клетки. При дальнейшем развитии нейроэпителиальные клетки начинают подавлять свои эпителиальные признаки и происходит постепенное приобретение глиальных свойств, чтобы в конечном итоге становится однородной популяцией радиальной глии. Клетки радиальной глии представляют собой пул NSCs с глиальным фенотипом, присутствующие в развивающемся мозге и сохраняющимися в субветрикулярной (SVZ) и субгранулярной (SGZ) зонах постнатального и взрослого мозга [7], прогениторные клетки активно пролиферируют и дифференцируются. Клетки радиальной глии подвергаются асимметричному дифференцирующему делению, генерируя новую клетку радиальной глии и базальную прогениторную клетку [8, 9]. Обнаружено, что базальная прогениторная клетка дополнительно симметрично делится для генерации двух нейробластов и в конечном итоге дифференцируется в нейроны [10].

В постнатальном периоде развития основной вклад в нейрогенез вносят популяции стволовых и прогениторных клеток, находящиеся в пределах нейрогенных ниш, где, благодаря микроокружению, формируемому клетками эндотелия, астроглии, они могут дать начало новым нейронам. И в эмбриональном, и в постнатальном периодах развития организма процессы нейрогенеза тесно сопряжены с механизмами клеточной гибели (апоптоз), особенно на стадии пролиферации прогениторных клеток.

В настоящее время общепринятой является точка зрения о том, что нейрогенез в эмбриональном периоде развития важен для формирования структур мозга, тогда как нейрогенез в постнатальном периоде актуален с точки зрения нейропластичности как таковой: появление новых нейронов важно для формирования памяти с достаточной разрешающей способностью, обучения и эмоций. Интенсивность нейрогенеза в разные стадии постнатального развития может существенно различаться, более того, до сих пор нет консенсуса по поводу интенсивности постнатального нейрогенеза у высших приматов

и человека. Вместе с тем влияние различных факторов (физических, химических, биологических, в том числе социальных) на нейрогенез, а также его нарушения при развитии широкого спектра заболеваний центральной нервной системы неоспоримы в современной нейробиологии и неврологии.

### Методологические аспекты регистрации интенсивности нейрогенеза *in vitro* и *in vivo*

Изучение нейрогенеза в эмбриональном и взрослом головном мозге является одним из активно развивающихся направлений современной нейробиологии. Методологически это сопряжено с некоторыми сложностями, что обусловлено как малой доступностью методов для прижизненной визуализации событий в нейрогенных нишах, так и вариабельностью процесса нейрогенеза при действии большого числа внешних факторов, влияющих на процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

Наиболее распространенный метод маркировки делящихся клеток подразумевает регистрацию включения молекулы-зонда в реплицирующуюся ДНК во время митоза. Раньше для этих целей использовался 3Н-тимидин, позволяющий проводить радиографическое отслеживание клеток в ткани, в 1990-х годах был впервые применен BrdU (бром-дезоксисуридин), позже — IdU и CldU (йодидный и хлоридный эквиваленты уридина соответственно), что позволило идентифицировать вновь образованные клетки иммуногистохимически [11].

Фенотипирование NSCs/NPCs в образцах ткани головного мозга или в культуре *in vitro* осуществляется по оценке экспрессии большого спектра молекул (Таблица 1).

«Молчащие» и активированные NSCs/NPCs могут быть фенотипированы по наличию следующего антигенного состава: В SVZ «молчащие» NSCs имеют экспрессионный профиль GFAP+CD133+Nestin-, активированные NSCs — GFAP+CD133+Nestin+, а также экспрессируют монокарбоксилатные транспортеры MCT1 для активного транспорта лактата. В SGZ «молчащие» NSCs имеют экспрессионный профиль GFAP+Nestin+PCNA-, активированные NSCs —

GFAP+(–)+Nestin+PCNA++ и имеют низкий уровень экспрессии MCT1 в силу уже подавленного в них (по сравнению с «молчащими» клетками) гликолиза и сниженной продукции лактата [12]. Медленно делящиеся NSCs (так называемый 1-й тип клеток, соответствующий радиальной глии и имеющий два морфологических подкласса, один из которых — клетки с горизонтальными отростками — отличается активной пролиферацией) характеризуется экспрессией Pax6 и отсутствием экспрессии NeuroD1, тогда как амплифицирующиеся прогениторные клетки (так называемый 2-й тип клеток) характеризуются одновременной экспрессией Pax6 и NeuroD1, в то же время NeuroD1 коэкспрессируется с Tbr1 на прогениторных клетках 3-го типа, которые митотически активны, но уже экспрессируют маркеры нейральной дифференцировки [13]. Примечательно, что морфологически отличающиеся NSCs могут по-разному отвечать на митогенные стимулы (например, активацию Notch-сигналинга) [14]. Считается, что супрессия нейрогенеза при старении связана с увеличением относительного количества «молчащих» NSCs и истощением их ресурсов к активации [15].

В процессе развития от клеток радиальной глии до зрелых нейронов экспрессия различных белков-маркеров, а также морфология и активность клеток существенно меняются. В частности, в SGZ гиппокампа клетки, относящиеся к группе NSCs/NPCs, характеризуются экспрессией GFAP, Sox2, NeuroD, PSA-NCAM, Nestin, Pax6, имеют округлую форму, у них отсутствует электровозбудимость. Нейробласты продолжают экспрессировать NeuroD, PSA-NCAM, в них появляется экспрессия DCX, формируются отростки, они демонстрируют высокий уровень электровозбудимости, а ГАМК вызывает в них возбуждающий эффект. В незрелых нейронах, которые демонстрируют способность к миграции, экспрессируются DCX, NeuN, Prox1, их отростки достигают других субрегионов гиппокампа, появляются электрофизиологические признаки внутригиппокампальной интеграции клеток, ГАМК начинает проявлять ингибиторную активность, а глутамат — возбуждающую, именно в этих клетках

впервые регистрируется экспрессия генов немедленного раннего ответа (*c-fos*, *jun*, *Arc*, *Homer1*), что соответствует ответу клеток на стимулирующее действие нейромедиаторов. В зрелых нейронах экспрессируются *NeuN*, *Prox1*, кальбиндин, отростки

имеют большую степень разветвленности, формируются стабильно активные синапсы, проявляются все характеристики синаптической пластичности, клетки отвечают экспрессией генов немедленного раннего ответа на стимуляцию [16].

Таблица 1

Основные маркеры, экспрессируемые нейральными стволовыми клетками

№	Маркер	Краткая характеристика	Источник
1	Nestin	Нейроэпителиальный белок стволовых клеток, который экспрессируется в NSCs и исчезает при дифференцировке. Является необходимым для выживания и самообновления NSCs.	[92]
2	Sox2	Транскрипционный фактор, имеет высокую экспрессию в эмбриональных стволовых клетках и NSCs взрослого мозга во время развития, а также в клетках, которые дифференцируются по глиальному пути.	[93]
3	Notch1	Трансмембранный рецептор, который регулирует формирование, миграцию и дифференцировку нейрональных клеток.	[3]
4	HES1 и HES3	Транскрипционные факторы, которые поддерживают симметричное деление стволовых клеток.	[94]
5	Vimentin	Белок промежуточных филаментов, который экспрессируется в глиальных клетках (радиальная глия, незрелые астроциты).	[3]
6	PAX6	Фактор транскрипции, который обладает способностью определять путь развития клеток нейрональной природы.	[95]
7	GFAP	Глиальный фибриллярный кислый белок, известный как маркер астроцитов и клеток радиальной глии.	[96]
8	Mash1	Транскрипционный фактор, необходимый для эмбриональной нейрональной дифференцировки.	[97]
9	GLAST и GLT1	Глутаматные транспортеры — маркеры клеток глиальной природы.	[98]

Оценка нейрогенеза *in vitro* может быть осуществлена с использованием технологий анализа пролиферации клеток в режиме реального времени, например, с применением технологии xCelligence [17], однако такие результаты должны сопоставляться с данными иммунофенотипирования.

Существенным лимитирующим фактором в оценке нейрогенеза является трудность в его регистрации *in vivo*. Для преодоления этого ограничения были предложены различные подходы, в частности, позитронно-эмиссионная томография, магнитно-резонансная томография, функциональная магнитно-резонансная томография, магнитно-резонансная спектроскопия, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки [18—20].

### Нейрогенные ниши головного мозга

В мозге взрослого млекопитающего нейрогенез весьма лимитирован и продолжается в течение всей жизни в нейрогенных нишах двух регионах: субвен-

трикулярной зоне (SVZ) боковых желудочков (LV) и субгранулярной зоне (SGZ) зубчатой извилины в гиппокампе [21, 22].

В SVZ взрослого мозга GFAP-экспрессирующие астроциты представляют собой популяцию NSCs (так называемые В/В1 клетки), причем В-клетки взаимодействуют с кровеносными сосудами. Сформировавшиеся нейробласты и незрелые нейроны мигрируют у млекопитающих (не у высших приматов) по роstralному миграционному тракту в обонятельные луковицы, где они дифференцируются в зрелые нейроны и остаются в пределах гранулярного и перигломерулярного слоев. Примечательно, что у высших приматов незрелые клетки тоже мигрируют из SVZ, но, вероятнее всего, они ориентированы на восполнение структурных дефектов в участках повреждения головного мозга [23].

В SGZ гиппокампа взрослого мозга GFAP+Nestin+Sox2+ клетки радиальной глии (RGL) (I тип клеток) представляют собой «молчащие»

NSCs, активация которых приводит к образованию прогениторных клеток (тип 2a, тип 2b). Стволовые и прогениторные клетки развиваются до незрелых нейронов (тип 3), мигрирующих во внутренний гранулярный слой зубчатой извилины, где они дифференцируются до зрелых гранулярных клеток. Новые нейроны, отличающиеся повышенной возбудимостью, направляют свои отростки в молекулярный слой и проецируют аксоны к СА3 субрегиону гиппокампа, что обеспечивает их полную функциональную интеграцию, что, начиная от процесса активации NSCs, может занимать, по разным данным, от 2 до 6 недель [24]. Важно отметить, что при образовании 3-го типа клеток (незрелые нейроны) значительно интенсифицируется процесс апоптоза (около 1—2 недель с момента активации NSCs), что важно для контроля популяции вновь образующихся нейронов.

Интересно отметить, что важным отличием незрелых и зрелых нейронов, образующихся в динамике нейрогенеза, является их ответ на действие ГАМК. Известно, что в пренатальном периоде ГАМК действует на нейроны головного мозга как возбуждающий нейромедиатор, однако в интранатальном периоде благодаря эффектам окситоцина, чья концентрация значительно возрастает во время родов, происходит «переключение» возбуждающего эффекта ГАМК на ингибиторный, который сохраняется на протяжении всей жизни организма. Однако ответ нейробластов и незрелых нейронов в нейрогенных нишах также демонстрирует возбуждающий эффект ГАМК, что, как и в случае пренатального развития, обусловлено особенностями экспрессии хлорных транспортеров NKCC1, KCC2 [25, 26].

В ряде экспериментальных исследований было убедительно показано, что различные факторы и сигналы регулируют образование, деление и миграцию клеток-предшественников, в частности, нейротрансмиттеры, нейропептиды, гормоны, цитокины, внешние стимулы, инициирующие процессы обучения, запоминания, выражения эмоций, а также сложные формы поведения и стресс-ответ организма [26—29]. В то же время появляется все больше свидетельств того, что мозг взрослого млекопитающего содер-

жит другие нейрогенные ниши, которые способны генерировать новые нейроны и глиальные клетки, особенно после повреждения или после некоторых индуктивных стимулов, например, в участках повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера (при ишемическом повреждении головного мозга), в некоторых регионах головного мозга, где сохраняются клетки с пролиферативным потенциалом (например, в гипоталамусе, миндалевидном теле, в мозжечке) [30—33]. Не менее существенным может оказаться вклад нейронов с пролонгированной незрелостью, которые обнаруживаются в коре головного мозга на протяжении всей жизни млекопитающих и потенциально могут участвовать в формировании новых клеток нейрональной природы [34, 35], а также астроцитов паренхимы головного мозга (кора, стриатум), чья конверсия в стволовые клетки была экспериментально доказана [36, 37]. Вместе с тем нельзя игнорировать наблюдения, ставящие под сомнение значимость процессов нейрогенеза во взрослом мозге человека: не исключено, что образование новых нейронов практически полностью приостанавливается после 7—13-летнего возраста [38, 39].

Важной составляющей нейропластичности является церебральный ангиогенез, что обеспечивает образование так называемого васкулярного скаффолда для развивающихся клеток нейрональной и глиальной природы, при этом структурная и функциональная целостность эндотелиального слоя диктует особенности нейрогенеза в нейрогенных нишах: в SVZ повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера (например, вследствие меньшего покрытия эндотелия и перicyтов отростками периваскулярной астроглии) необходима для секреции в нишу факторов роста и других регуляторных молекул, тогда как в SGZ проницаемость стенки церебральных микрососудов существенно ниже, и основная часть гуморальных факторов, регулирующих нейрогенез, секретируется локально [40, 41].

Известно, что церебральный неоангиогенез индуцируется после перенесенного ишемического повреждения головного мозга [42] и при нейродегенерации [43], причем проницаемость таких вновь образованных сосудов повышена, что, вероятно, от-

ответственно за формирование новых сайтов нейрогенеза в поврежденном мозге, например, в стенке 3-го и 4-го желудочков [33]. Позже было показано, что эти события сопряжены с активностью механизмов, утилизирующих Notch-сигналинг: клетки эндотелия и перициты церебральных микрососудов начинают экспрессировать лиганд Notch-рецептора — Delta-like ligand —4 (DLL4) — в ответ на высокий уровень сосудисто-эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor — VEGF) в системной циркуляции, что приводит к активации митоза NSCs и запуску процесса нейрогенеза в стенках желудочков головного мозга [44]. Очевидно, что не менее важную роль неангиогенез играет при развитии головного мозга и при реализации феномена нейропластичности: например, инсулиноподобный фактор роста-1 (insulin-like growth factor-I — IGFR-I) и сосудисто-эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor (VEGF) стимулируют при физической и когнитивной нагрузке и нейрогенез, и церебральный ангиогенез [45—47].

Механизмы развития сосудов базируются на дивергенции ключевых свойств клеток церебрального эндотелия (tip-клетки, экспрессирующие DLL4, и stalk-клетки, экспрессирующие Notch-рецептор в ответ на действие VEGF), и это обеспечивает миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток с ангиогенным потенциалом в ткани головного мозга, контролируемую активностью Hes/Neu факторов транскрипции в клетках [48]. Иными словами, VEGF выступает в этом контексте как важный регулятор ангиогенного спрутинга, будучи секретлируемым клетками эндотелия, астроглии и нейронами в участках интенсивного неангиогенеза, например, за счет активности гипоксия-индуцибельного фактора-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) [48].

Не менее актуальным может быть увеличение локальной концентрации лактата как продукта метаболической активности астроцитов в пределах нейроваскулярной единицы головного мозга [49] и действие некоторых «неклассических» проангиогенных факторов, например,  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ ) [50]. Tip-клетки эндотелия характеризуются высоким уровнем экспрессии рецепторов VEGFR (VEGFR) второго типа (VEGFR2) по сравнению с рецепторами первого типа

(VEGFR1 или Flt1), что отличает их от stalk-клеток, следующих за ними в растущем сосуде [48]. Растворимая форма VEGFR1 проявляет антиангиогенное действие, что ассоциировано с активностью Wnt-сигналинга, инициируемого взаимодействием Wnt-лиганда с трансмембранным рецептором семейства Frizzled с последующей активацией транскрипции генов через  $\beta$ -катенин, мигрирующий в ядро клетки [51]. В целом, вклад механизмов, связанных с активацией ангиогенеза и формированием сосудистого скаффолда в нейрогенных нишах головного мозга, настолько значим, что общепризнанной является необходимость реконструкции такого скаффолда при моделировании нейрогенной ниши *in vitro* [52], а также для формирования функционально компетентных органоидов головного мозга из индуцированных плюрипотентных клеток (induced pluripotent stem cells — iPSCs) [53]. Частично аналогичные задачи решаются при создании сфероидных моделей гематоэнцефалического барьера и нейроваскулярной единицы головного мозга [54].

Вместе с тем актуальными остаются вопросы о том, что определяет судьбу стволовых и прогениторных клеток в нейрогенной нише, как скоординированы между собой процессы нейрогенеза и церебрального ангиогенеза. Очевидно, что действие разнообразных факторов, стимулирующих (обогащенная многостимульная среда, когнитивный тренинг) и подавляющих (стресс, недостаток нутриентов) нейрогенез, в конечном счете, приводит к динамическим изменениям транскрипционной активности в NSCs/NPCs и параметрам функционирования клеток васкулярного скаффолда в нейрогенной нише.

### **Протеолиз клеточных белков и регуляция нейрогенеза и церебрального ангиогенеза**

На протяжении последних двух десятилетий внимание исследователей привлечено к механизмам формирования и реализации эффектов продуктов протеолиза мембранных белков. В совокупности эти механизмы относятся к феномену так называемого внутримембранного регулируемого протеолиза (regulated intramembrane proteolysis — RIP), который

обеспечивает генерацию пептидов с различной биологической активностью. RIP реализуется в клетках за счет активности интрамембранных ферментов (пресенилин, протеаза S2P, ромбовидная сериновая протеаза), других протеаз (например, шеддаз, которые генерируют внеклеточные фрагменты трансмембранных белков), мишенью действия которых являются трансмембранные белки с различной топологией, а результатом действия — генерация внеклеточного и внутриклеточного фрагментов пептидов [55, 56]. Ферментный комплекс ( $\gamma$ -секретаза) состоит из 4-х белков (пресенилин, никастрин, Aph-1, Pen-2), результатом работы этого комплекса является образование пептидов, которые могут транслоцироваться в ядро клетки и инициировать транскрипцию генов, либо могут связываться в цитозоле с другими белками и участвовать в сигнальной трансдукции [55]. К настоящему времени роль  $\gamma$ -секретазы в (пато)физиологии эмбрионального и взрослого головного мозга (с точки зрения развития головного мозга, механизмов реализации синаптической пластичности) хорошо изучена [57, 58]. Например, подавление активности  $\gamma$ -секретазы имеет своим результатом интенсификацию дифференцировки NPCs (в  $\beta$ -катенин-зависимом формате) *in vitro* [59].

Субстратами для ферментов RIP могут выступать Notch-рецептор (генерируемый в клетках в результате его связывания с лигандами Delta или Jagged и активности металлопротеиназ), рецептор 1-го типа VEGF (VEGFR1), белок-предшественник амилоида (APP), рецептор IGF-I (insulin-like growth factor-I receptor — IGF-IR), рецептор эпидермального фактора роста (Erb4), кадгерин, CD44, другие разнообразные рецепторные протеинкиназы, например, VEGFR3, FGFR4, TRKA, MUSK, MER, TYRO3, ERNA2, ERNA5, ERNA7, ERNB3, ERNB4, and ERNB6, и другие молекулы [55, 60, 61]. В частности, установлено, что пресенилин катализирует интрамембранный и внутриклеточный протеолиз Notch и APP, что важно для генерации биологически активных фрагментов этих пептидов, высвобождающихся во внеклеточное пространство ( $N\beta$ ,  $A\beta$ ) или мигрирующих в цитозоль и ядро клетки (Notch intracellular domain — NICD, Amyloid precursor

protein intracellular domain — AICD), а также участвует в протеолитической деградации бета-катенина в Wnt-сигналинге [62, 63].

При протеолизе Notch образуется NICD, который перемещается в ядро клетки и, взаимодействуя с ДНК-связывающим белком CSL (который в отсутствие NICD находится в комплексе с гистон-деацетилазой HDAC1 и подавляет транскрипцию соответствующих ген), а также с белком Mastermind, запускает транскрипцию генов, в частности, c-Myc, cyclin D1, p21, IL-4, а также Hes и Hey, которые кодируют транскрипционные факторы, предотвращающие дифференцировку и сохраняющие пул NSCs [64]. При протеолизе APP генерируется AICD, который транслоцируется в ядро клетки и, будучи стабилизированным в клетке за счет взаимодействия с белком Fe65 или за счет образования комплекса с гистон-ацетилтрансферазой Tip60, регулирует экспрессию генов, в частности, GSK3 $\beta$ , p53, Hes1, LRP1 и др. [65].

Было обнаружено, что осцилляции экспрессии генов Hes1 и Ascl1 характеризуют конверсию «молчащих» NSCs в активные стволовые клетки, вступающие в клеточный цикл: высокая экспрессия Hes1 и низкая экспрессия Ascl1 характеризуют состояние «покоя» стволовых клеток головного мозга [66, 67]. С учетом того, что Ascl1 играет важную стимулирующую роль в Wnt-сигналинге, а Hes1 выступает в качестве молекулы-эффиктора Notch, не удивительно, что Wnt/Notch-сигнальная трансдукция определяет дальнейшую судьбу NSCs/NPCs, в частности, их развитие по нейрональному или глиальному пути [68]. В целом, Notch-сигналинг является важным фактором регуляции активности процессов нейрогенеза [69]. Wnt/Notch-сигналинг актуален и для процессов ангиогенеза [70], которые сопровождают механизмы нейропластичности. В частности, установлено, что судьба клеток в составе нейрогенных ниш в значительной степени зависит от сосудистого скаффолда, а проницаемость сосудистой стенки определяет биодоступность многих молекул с регуляторной активностью в нише [41, 49]. Интересно, что между двумя путями, связанными с протеолизом Notch и APP, вероятно, существуют

антагонистические отношения: в частности, образующийся AICD подавляет транскрипционную активность NICD [71]. Такой тип взаимодействий находит свое отражение, например, в реализации проангиогенной активности APP и A $\beta$ , что ассоциировано с подавлением Notch-сигналинга в клетках церебрального эндотелия и перицитах [50].

Кроме того, NICD выступает в качестве «интегратора» нескольких важных сигнальных путей (Wnt, HIF-1), что во многом определяется NICD-контролируемой экспрессией транскрипционного фактора Hes [72]. Так, например, объектом Notch-опосредованной регуляции выступает метаболизм стволовых или прогениторных клеток. Известно, что активация NSCs/NPCs сопровождается значимыми изменениями их метаболического статуса. В частности, «молчащие» стволовые клетки SVZ демонстрируют зависимость от продукции лактата и окисления жирных кислот, тогда как стимуляция их пролиферативной активности приводит к увеличению вклада митохондриального дыхания, интенсификации митохондриального биогенеза, снижению утилизации жирных кислот [73—75]. Гены, кодирующие белки-ферменты гликолиза, транспортеры глюкозы, а также репрессоры цикла Кребса, находятся под позитивным контролем Notch, иными словами, активность Notch-сигналинга способствует развитию в тканях эффекта Варбурга [76], что, очевидно, необходимо для поддержания популяции «молчащих» стволовых клеток и их плюрипотентности. Это, в частности, было показано при активации Notch-Hes1 сигнальной трансдукции и соответствовало активации транскрипционного фактора HIF-1 [77]. Если Notch-сигналинг подавлен, то NSCs в нейрогенных нишах взрослого мозга быстро вступают в митоз, нейрогенез интенсифицируется, однако очень скоро пул стволовых клеток полностью истощается [78]. Таким образом, метаболические изменения, диктуемые, в числе прочих факторов, активностью Notch-опосредованных механизмов, необходимы для поддержания адекватного уровня «молчащих» NSCs, которые потенциально смогут дать начало новым нейронам в течение всей жизни организма. В соответствии с теорией гиппокампального клиренса истощение процесса нейрогенеза

приведет к неэффективной экстрагиппокампальной консолидации новых воспоминаний, но не затронет (или даже улучшит) сохранение старых воспоминаний [79].

Примечательно, что нейрогенез в стриатуме и в коре головного мозга из постмитотических дифференцированных астроцитов может быть инициирован подавлением в этих клетках Notch-сигналинга (например, после ишемического повреждения), причем полноценное прохождение всех этапов нейрогенеза из астроглии паренхимы мозга требует (на стадии амплифицирующихся нейробластов) дополнительного действия эпидермального фактора роста [37, 80].

Известно, что еще один продукт RIP — AICD — выступает в качестве супрессора пролиферации NPCс и индуктора апоптоза нейронов, хотя есть и данные, свидетельствующие о противоположных эффектах. Внеклеточный A $\beta$  стимулирует пролиферацию NPCс и миграцию нейробластов, способствует их дифференцировке в нейроны, но проявляет такие эффекты только в физиологических (пикомолярных), но не супрафизиологических (наномолярных) концентрациях [81, 82]. Кроме того, показано, что подавление активности  $\gamma$ -секретазного комплекса нарушает процессы ангиогенеза и барьерогенеза в развивающемся головном мозге, тогда как присутствие в среде культивирования церебральных эндотелиоцитов A $\beta$  в низких концентрациях оказывает проангиогенный эффект [83, 84]. Действуя в высоких концентрациях, A $\beta$  провоцирует развитие aberrантного ангиогенеза, характеризующегося избыточным образованием сосудистой сети с патологически увеличенной проницаемостью [43], вероятно, через взаимодействие с RAGE-рецепторами [85].

Контролируемому интрамембранному протеолизу подвергаются и рецепторы сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF (VEGFR1, VEGFR3), который является мощным регулятором процессов нейрогенеза и ангиогенеза. VEGFR1 с большей аффинностью связывает VEGF-A, а опосредованное активностью  $\gamma$ -секретазы образование внутриклеточного пептида из VEGFR1 приводит к подавлению ангиогенеза и является, таким образом, антагонистическим по отно-

шению к эффектам активации VEGFR2 [86]. Действуя через VEGFR1, VEGF-A выступает в качестве пронейрогенного фактора, стимулирующего пролиферацию и миграцию NPCs и, вероятно, нейробластов [87—89]. Еще один субстрат RIP — VEGFR3 — экспрессируется на клетках радиальной глии в SVZ и необходим как для процессов нейрогенеза, так и церебрального ангиогенеза [90]. В SGZ гиппокампа активация VEGFR3 актуальна для конверсии «молчащих» NSCs в NPCs и реализацию последующих этапов нейрогенеза [91].

### Выводы

Продукты регулируемого интрамембранного протеолиза играют важную роль в регуляции нейрогенеза. Молекулы, генерируемые за счет активности протеаз RIP, могут стимулировать или подавлять активность стволовых и прогениторных клеток, их пролиферацию и дифференцировку, миграцию и интеграцию вновь образованных нейронов в существующие синаптические ансамбли. Локальный неоангиогенез поддерживает процессы нейрогенеза в нейрогенных нишах, что гарантируется мультивалентным действием пептидов, формирующихся из трансмембранных белков (например, NICD, AICD). Реципрокные влияния NSCs/NPCs и клеток микрососудов, а также присутствие в составе ниши других клеток-продуцентов факторов, контролируемых нейрогенез (астроциты, микроглия) позволяют сделать вывод о том, что нейрогенная ниша является уникальной моделью, сочетающей в себе активность васкулярного скаффолда, пула клеток с высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом (NSCs/NPCs), а также иных клеток и гуморальных факторов, регулирующих процессы развития. Идентификация новых молекул-регуляторов процессов нейропластичности из числа ферментов, субстратов и продуктов RIP обеспечит разработку новых протоколов регистрации нейрогенеза, ангиогенеза и их направленной фармакологической модуляции.

### Библиографический список / References

- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.
- Trentesaux C, Striediner K, Pomerants J, et al. From gut to glutes: The critical role of niche signals in the maintenance and renewal of adult stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2020;63:88-101. doi: 10.1016/j.ceb.2020.01.004.
- Obernier K, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*. 2019;146(4). doi: 10.1242/dev.156059.
- Nicaise AM, Willis C, Crocker S, et al. Stem Cells of the Aging Brain. *Front Aging Neurosci*. 2020;12:247. doi: 10.3389/fnagi.2020.00247.
- Moyse E, Segure S, Lierd O, et al. Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008;3(3):163-84. doi:10.2174/157488808785740334.
- Shetty AK, Hattiangady B. Grafted Subventricular Zone Neural Stem Cells Display Robust Engraftment and Similar Differentiation Properties and Form New Neurogenic Niches in the Young and Aged Hippocampus. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(9):1204-15. doi: 10.5966/sctm.2015-0270.
- Beattie R, Hippenmeyer S. Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS letters*. 2017;591(24):3993-4008. doi:10.1002/1873-3468.12906.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*. 2009;32:149-184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003;6(11):1127-34. doi:10.1038/mm1144.
- Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*. 2003;43(1):37-43. doi:10.1002/glia.10250.
- Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*. 2007;53(1):198-214. doi:https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.002.
- Wang YZ, Plane JM, Jiang P, et al. Concise review: Quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2011;29(6):907-912. doi:10.1002/stem.644.
- Hodge RD, Hevner RF. Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Developmental neurobiology*. 2011;71(8):680-689. doi:10.1002/dneu.20882.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, et al. Quiescent and Active Hippocampal Neural Stem Cells with Distinct Morphologies Respond Selectively to Physiological and Pathological Stimuli and Aging. *Cell Stem Cell*. 2010;6(5):445-456. doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.017.
- Encinas JM, Sierra A. Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*. 2012;227(2):433-439. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.010.
- Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A. Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Reviews in the Neurosciences*. 2015;26(3):269. doi:https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0071.
- Salmin VV, Komleva YK, Kuvacheva NV, et al. Differential Roles of Environmental Enrichment in Alzheimer's Type of Neurodegeneration and Physiological Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017;9(245). doi:10.3389/fnagi.2017.00245.
- Ho NF, Amar S, Holt DJ, et al. In vivo imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise. *Molecular Psychiatry*. 2013;18(4):404-416. doi:10.1038/mp.2013.8.
- Couillard-Despres S, Vreys R, Aigner L, et al. In vivo monitoring of adult neurogenesis in health and disease. *Frontiers in*

*Neuroscience*. 2011;5:67. doi:10.3389/fnins.2011.00067.

20. Tamura Y, Kataoka Y. PET imaging of neurogenic activity in the adult brain: Toward in vivo imaging of human neurogenesis. *Neurogenesis*. 2017;4(1). e1281861. doi:10.1080/23262133.2017.1281861.

21. Komleva Y, Kuvacheva NV, Malinovskaya NA, et al. Regenerative potential of the brain: Composition and forming of regulatory microenvironment in neurogenic niches. *Human Physiology*. 2016;42:865-873. doi:10.1134/s0362119716080077.

22. Fuentealba LC, Obermier K, Alvarez-Buylla A. Adult Neural Stem Cells Bridge Their Niche. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(6):698-708. doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.012.

23. Falcão AM, Margues F, Novais A, et al. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front Cell Neurosci*. 2012;6:34. doi:10.3389/fncel.2012.00034.

24. Bernstock J, Verheyen J, Huang B, et al. Typical and Atypical Stem Cell Niches of the Adult Nervous System in Health and Inflammatory Brain and Spinal Cord Diseases. in: *Adult Stem Cell Niches*. Edited by Sabine Wislet. IntechOpen. 2014. doi: 10.5772/58599

25. Pontes A, Zhang Y, Hu W. Novel functions of GABA signaling in adult neurogenesis. *Frontiers in Biology*. 2013;8(5). doi: 10.1007/s11515-013-1270-2.

26. Lopatina OL, Malinovskaya N, Komleva YK, et al. Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Rev Neurosci*. 2019;30(8):807-820. doi: 10.1515/revneuro-2019-0014.

27. Morgun A, Osipova ED, Shuvaev A, et al. Astroglia-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche in vitro treated with A $\beta$ 1-42. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2019;65:366-373. doi: 10.18097/pbmc20196505366.

28. Berdugo-Vega G, Arias-Gil G, Lopez-Fernandes A, et al. Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nature communications*. 2020;11(1):135. doi: 10.1038/s41467-019-14026-z.

29. Berg DA, Kirkham M, Beljajeva A, et al. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development*. 2010;137(24):4127-4134. doi: 10.1242/dev.055541.

30. Jurkowski MP, Bettio L, Woo EK, et al. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020;14(293). doi: 10.3389/fncel.2020.576444.

31. Mooney SJ, Shan K, Yeung S, et al. Focused Ultrasound-Induced Neurogenesis Requires an Increase in Blood-Brain Barrier Permeability. *PLoS One*. 2016; 11(7). e0159892-e0159892. doi: 10.1371/journal.pone.0159892.

32. Feliciano DM, Bordey A, Bonfanti L. Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015; 7(10). doi: 10.1101/cshperspect.a018846.

33. Lin R, Cai J, Nathan C, et al. Neurogenesis is enhanced by stroke in multiple new stem cell niches along the ventricular system at sites of high BBB permeability. *Neurobiology of Disease*. 2015;74:229-239. doi: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.016.

34. Varea E, Bellas M, Videira S, et al. PSA-NCAM is Expressed in Immature, but not Recently Generated, Neurons in the Adult Cat Cerebral Cortex Layer II. *Frontiers in Neuroscience*. 2011;5(17). doi: 10.3389/fnins.2011.00017.

35. La Rosa C, Ghibaudi M, Bonfanti L. Newly Generated and Non-Newly Generated "Immature" Neurons in the Mammalian Brain: A Possible Reservoir of Young Cells to Prevent Brain Aging and Disease? *Journal of clinical medicine*. 2019;8(5):685. doi: 10.3390/jcm8050685.

36. Péron S, Berninger B. Reawakening the sleeping beauty in the adult brain: neurogenesis from parenchymal glia. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;34:46-53. doi: 10.1016/j.gde.2015.07.004.

37. Magnusson JP, Zamboni M, Santopolo G, et al. Activation of a neural stem cell transcriptional program in parenchymal astrocytes. *eLife*. 2020;9. doi: 10.7554/eLife.59733.

38. Sorrells SF, Paredes M, Cebrian-Silla A, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018;555(7696):377-381. doi: 10.1038/nature25975.

39. Prolisi R, Cozzi B, Bonfanti L. Humans and Dolphins: Decline and Fall of Adult Neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12(497). doi: 10.3389/fnins.2018.00497.

40. Salmina AB, Morgun A, Kuvacheva NA, et al. Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story. *Rev Neurosci*. 2014;25(1):97-111. doi: 10.1515/revneuro-2013-0044.

41. Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Komleva YK, et al. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. *Rev Neurosci*. 2017;28(4):397-415. doi: 10.1515/revneuro-2016-0071.

42. Font MA, Arboix A, Krupinski J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Current cardiology reviews*. 2010;6(3):238-244. doi: 10.2174/157340310791658802.

43. Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, et al. Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularization in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2011;6(8). e23789. doi: 10.1371/journal.pone.0023789.

44. Lin R, Cal J, Kenyon L, et al. Systemic Factors Trigger Vasculature Cells to Drive Notch Signaling and Neurogenesis in Neural Stem Cells in the Adult Brain. *STEM CELLS*. 2019;37(3):395-406. doi: https://doi.org/10.1002/stem.2947.

45. Cotman C, Berchtold N, Christie LA. Exercise Builds Brain Health: Key Roles of Growth Factor Cascades and Inflammation. *Trends in neurosciences*. 2007;30:464-72. doi: 10.1016/j.tins.2007.06.011.

46. Louissaint A, Rao S, Leventhal C, et al. Coordinated Interaction of Neurogenesis and Angiogenesis in the Adult Songbird Brain. *Neuron*. 2002;34(6):945-960. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00722-5.

47. Kerr AL, Steuer EL, Pochtarev V, et al. Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. *Neuroscience*. 2010; 171(1):214-26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.008.

48. Tata M, Ruhrberg C, Fantin A. Vascularisation of the central nervous system. *Mechanisms of development*. 2015;138:1:26-36. doi: 10.1016/j.mod.2015.07.001.

49. Salmina AB, Kuvacheva NV, Morgun AV, et al. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 64:174-84. doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.005.

50. Durrant CS, Ruscher K, Sheppard O, et al. Beta secretase 1-dependent amyloid precursor protein processing promotes excessive vascular sprouting through NOTCH3 signalling. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):98. doi: 10.1038/s41419-020-2288-4.

51. Stefater JA, Lewkowich I, Rao S, et al. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature*. 2011;474(7352):511-5. doi: 10.1038/nature10085.

52. Shin Y, Yang K, Han S, et al. Reconstituting vascular microenvironment of neural stem cell niche in three-dimensional extracellular matrix. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(9):1457-64. doi: 10.1002/adhm.201300569.

53. Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nature Methods*. 2019;16(11):1169-1175. doi: 10.1038/s41592-019-0586-5.

54. Nzou G, Wicks RT, Wicks CC, et al. Human Cortex

- Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. *Scientific Reports*. 2018;8(1):7413. doi: 10.1038/s41598-018-25603-5.
55. Boulton ME, Cai J, Grant MB. gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(3):781-795. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00274.x.
56. Lal M, Caplan M. Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(1):34-44. doi: 10.1152/physiol.00028.2010.
57. Jurisch-Yaksi N, Sannerud R, Annaert W. A fast growing spectrum of biological functions of  $\gamma$ -secretase in development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2013;1828(12):2815-2827. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.04.016.
58. Maia MA, Sousa E. BACE-1 and  $\gamma$ -secretase as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*. 2019;12(1). doi: 10.3390/ph12010041.
59. Gadadhar A, Marr R, Lazarov O. Presenilin-1 regulates neural progenitor cell differentiation in the adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(7):2615-2623. doi: 10.1523/jneurosci.4767-10.2011.
60. Müller S, Scilabra S, Lichtenthaler S, et al. Proteomic Substrate Identification for Membrane Proteases in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016;9. doi: 10.3389/fnmol.2016.00096.
61. Merilahti JAM, Ojala VK, Knittle A, et al. Genome-wide screen of gamma-secretase-mediated intramembrane cleavage of receptor tyrosine kinases. *Molecular Biology of the Cell*. 2017;28(22):3123-3131. doi: 10.1091/mbc.e17-04-0261.
62. De Strooper B, Annaert W. Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. *The Journal of cell biology*. 2001;152(4):F17-F20. doi: 10.1083/jcb.152.4.f17.
63. Tarassishin L, Yin Ye I, Bassit B, et al. Processing of Notch and amyloid precursor protein by  $\gamma$ -secretase is spatially distinct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17050-17055. doi: 10.1073/pnas.0408007101.
64. Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009;137(2):216-233. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
65. Müller T, Scilabra S, Lichtenthaler S, et al. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics - Relevance for Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*. 2008;85:393-406. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.002.
66. Kageyama R, Ochi S, Sueda R, et al. The significance of gene expression dynamics in neural stem cell regulation. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2020;96(8):351-363. doi: 10.2183/pjab.96.026.
67. Sueda R, Imayoshi I, Harima Y, et al. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent vs. active neural stem cells in the adult mouse brain. *Genes Dev*. 2019;33(9-10):511-523. doi: 10.1101/gad.323196.118.
68. Bejoy J, Bijonowski B, Marzano M, et al. Wnt-Notch Signaling Interactions During Neural and Astroglial Patterning of Human Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*. 2019;26(7-8):419-431. doi: 10.1089/ten.tea.2019.0202.
69. Contreras EG, Egger B, Gold KS, et al. Dynamic Notch signalling regulates neural stem cell state progression in the Drosophila optic lobe. *Neural Development*. 2018;13(1):25. D doi: 10.1186/s13064-018-0123-8.
70. Olsen JJ, Other-Gee Pohl S, Deshmukh A, et al. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. *The Clinical biochemist. Reviews*. 2017;38(3):131-142.
71. Roncarati R, Sesyan N, Scheinfeld MN, et al. The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(10):7102-7. doi: 10.1073/pnas.102192599.
72. Borggrete T, Lauth M, Zwijsen A, et al. The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGF $\beta$ /BMP and hypoxia pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016; 1863(2):303-313. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.020.
73. Stoll EA, Makin R, Sweet IR, et al. Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids to Produce Energy and Support Neurogenic Activity. *STEM CELLS*. 2015;33(7):2306-19. doi: 10.1002/stem.2042.
74. Knobloch M, Pilz G-A, Ghesguiere B, et al. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Rep*. 2017;20(9):2144-2155. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.029.
75. Álvarez Z, Hyrossova P, Perales JC, et al. Neuronal Progenitor Maintenance Requires Lactate Metabolism and PEPCK-M-Directed Catepterosis. *Cereb Cortex*. 2016;26(3):1046-58. doi: 10.1093/cercor/bhu281.
76. Slaninova V, Krafcikova M, Perez-Gomes R, et al. Notch stimulates growth by direct regulation of genes involved in the control of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. *Open Biol*. 2016;6(2):150155. doi: 10.1098/rsob.150155.
77. Moriyama H, Moriyama M, Ozawa T, et al. Notch Signaling Enhances Stemness by Regulating Metabolic Pathways Through Modifying p53, NF- $\kappa$ B, and HIF-1 $\alpha$ . *Stem Cells and Development*. 2018;27(13):935-947. doi: 10.1089/scd.2017.0260.
78. Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, et al. Essential Roles of Notch Signaling in Maintenance of Neural Stem Cells in Developing and Adult Brains. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(9):3489-3498. doi: 10.1523/jneurosci.4987-09.2010.
79. Yau SY, Li A, So KF. Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. *Neural Plast*. 2015;717958. doi: 10.1155/2015/717958.
80. Magnusson JP, Goritz C, Tatarishvili J, et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science*. 2014;346(6206):237-41. doi: 10.1126/science.1246206.
81. Lazarov O, Demars MP. All in the Family: How the APPs Regulate Neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 2012;6:81-81. doi: 10.3389/fnins.2012.00081.
82. Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta neuropathologica*. 2020;140(4):417-447. doi: 10.1007/s00401-020-02196-w.
83. Ruzaeva VA, Morgun AV, Khilazheva ED, et al. [Development of blood-brain barrier under the modulation of HIF activity in astroglial and neuronal cells in vitro]. *Biomed Khim*. 2016;62(6):664-669. doi: 10.18097/pbmc20166206664.
84. Boscolo E, Folin M, Nico B, et al. Beta amyloid angiogenic activity in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. 2007;19(4):581-7.
85. Kook SY, Hong HS, Moon M, et al. A $\beta$ <sub>1-42</sub>-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca<sup>2+</sup>-calcineurin signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012; 32(26):8845-54. doi: 10.1523/jneurosci.6102-11.2012.
86. Cai J, Jiang WG, Grant MB, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3604-13. doi:10.1074/jbc.M507401200.
87. Jin K, Zhu Y, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18): 11946-50. doi:10.1073/pnas.182296499.

88. Zhang H, Vutskits L, Pepper M, et al. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol.* 2003;163(6):1375-84. doi: 10.1083/jcb.200308040.
89. Wittko IM, Schanzer A, Kuzmichev A, et al. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(27):8704-8714. doi:10.1523/jneurosci.5527-08.2009.
90. Calvo CF, Fontaine RH, Soueild J, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev.* 2011;25(8):831-44. doi:10.1101/gad.615311.
91. Han J, Calvo CF, Kang TH, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Controls Neural Stem Cell Activation in Mice and Humans. *Cell Reports.* 2015;10(7):1158-1172. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.049.
92. Park D, Xiang AP, Mao FF, et al. Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells. *STEM CELLS.* 2010;28(12):2162-2171. doi:10.1002/stem.541.
93. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine.* 2009;1(2):228-236. doi:10.1002/wsbm.12.
94. Hirata H, Tomita K, Bessho Y, et al. Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J.* 2001;20(16): 4454-66. doi:10.1093/emboj/20.16.4454.
95. Thakurela S, Tiwari N, Schick S, et al. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis. *Cell Discovery.* 2016;2(1):15045. doi:10.1038/celldisc.2015.45.
96. Horgusluoglu E, Nudelman K, Nho K, et al. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2017;174(1):93-112. doi:10.1002/ajmg.b.32429.
97. Wende CZ, Zoubaa S, Blak A, et al. Hairy/Enhancer-of-Split MEGANE and Proneural MASH1 Factors Cooperate Synergistically in Midbrain GABAergic Neurogenesis. *PLoS One.* 2015;10(5): e0127681. doi:10.1371/journal.pone.0127681.
98. Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int.* 2015;727542. doi:10.1155/2015/727542.

*Corresponding author:* Teplyashina Elena Anatolievna, Ph.D., Associate Professor, Department of Biological Chemistry with a course in medical, pharmaceutical and toxicological chemistry, research assistant of the Research Institute molecular medicine and pathobiochemistry Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, 660022, Partizan Zheleznyak str., 1, Krasnoyarsk, Russia. E-mail: elenateplyashina@mail.ru

Teplyashina E.A. ORCID: 0000-0001-7544-3779  
Komleva Yu.K. ORCID: 0000-0001-5742-8356  
Lychkovskaya E.V. ORCID: 0000-0002-4017-1125  
Salmina A.B. ORCID: 0000-0003-4012-6348

*Ответственный за переписку:* Тепляшина Елена Анатольевна, к.б.н., доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, старший научный сотрудник научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1. E-mail: elenateplyashina@mail.ru

Тепляшина Е.А. SPIN: 2753-7970; ORCID: 0000-0001-7544-3779  
Комлева Ю.К. SPIN: 1585-8130; ORCID: 0000-0001-5742-8356  
Лычковская Е.В. SPIN: 1875-5439; ORCID: 0000-0002-4017-1125  
Салмина А.Б. SPIN: 6504-7657; ORCID: 0000-0003-4012-6348

DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-127-135  
УДК 612.13

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ  
RESEARCH ARTICLE

## Анализ электрокардиограммы студентов с разным уровнем двигательной активности

А.С. Емельянова<sup>1</sup>, Л.А. Симонян<sup>2</sup>, Е.Е. Степура<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева, г. Рязань, Российская Федерация

<sup>2</sup>Государственный социально-гуманитарный университет, г. Коломна, Российская Федерация

\*chimik89@mail.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Оценка функционального состояния организма является одной из ведущих задач физиологии. В статье рассматривается анализ исходного вегетативного статуса студентов с разным уровнем двигательной активности. *Материалы и методы.* Регистрация и анализ variability сердечного ритма проведен с помощью современной комплексной электрофизиологической лаборатории «CONAN – 4.5». Оценена сердечная деятельность студентов, занимающихся физической культурой в рамках образовательного процесса на основе анализа variability сердечного ритма. *Результаты и обсуждение.* Выявлено, что среди всего изученного массива студентов (при дифференцировании исходного вегетативного статуса, рассчитанного по индексу напряжения) «нормотоники» характеризуются оптимальным соотношением между парасимпатическим и симпатическим отделами вегетативной нервной системы. При этом значение коэффициента физической активности у исследованных данной группы определялся на уровне значений  $1,73 \pm 0,1$ . *Выводы.* Для ваготоников значение триангулярного индекса составляло  $2,5 \pm 0,2$  у.е., что подтверждает представление о повышении влияния парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Значение у нормотоников –  $2,2 \pm 0,1$  у.е. Данная группа характеризовалась равновесием между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы. У симпатикотоников –  $1,9 \pm 0,5$  у.е., что подтверждает представление о повышении влияния симпатического отдела вегетативной нервной системы. У гиперсимпатикотоников –  $1,1 \pm 0,4$  у.е. Для обеспечения адекватного функционирования сердечно-сосудистой системы и для нормальной адаптации к физическим нагрузкам у студентов необходимо формировать уровень двигательной активности, количественно соответствующий коэффициенту физической активности не ниже 1,75.

**Ключевые слова:** электрокардиограмма, сердечно-сосудистая система, индекс напряжения, исходный вегетативный тонус, коэффициент физической активности

**Вклад авторов:** Емельянова А.С. – концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов. Степура Е.Е. – планирование и выполнение экспериментальной части исследования. Симонян Л.А. – обсуждение результатов, оформление введения и формулировка заключения.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.01.2021. Принята 11.02.2021.

© Emelyanova A.S., Simonyan L.A., Stepura E.E., 2021



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

**Для цитирования:** Емельянова А.С., Симонян Л.А., Степура Е.Е. Анализ электрокардиограммы студентов с разным уровнем двигательной активности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 127—135. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-127-135

## Heart rate variability analysis of students with different motor activity levels

A.S. Emelyanova<sup>1</sup>, L.A. Simonyan<sup>2</sup>, E.E. Stepura<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ryazan State Agrotechnological University, Ryazan, Russian Federation

<sup>2</sup>State Social and Humanitarian University, Kolomna, Russian Federation

\*Corresponding author: chimik89@mail.ru

**Annotation. Relevance.** Assessment of the functional state of the body is one of the leading tasks of physiology. The article deals with the analysis of the initial vegetative status of students with different levels of motor activity. **Materials and Methods.** Registration and analysis of the heart rate variability was carried out with the help of a modern complex electrophysiological laboratory «CONAN–4.5». The heart activity of students engaged in physical culture within the educational process was evaluated on the basis of heart rate variability analysis. **Results and Discussion.** It was revealed that among the entire studied array of students (with the differentiation of the initial vegetative status calculated according to muscle tension index), «normotonics» are characterized by an optimal ratio between the parasympathetic and sympathetic divisions of the autonomic nervous system. At the same time, the value of the coefficient of physical activity in the studied group was determined at the level of  $1.73 \pm 0.1$ . **Conclusion.** For vagotonics, the value of the triangular index was  $2.5 \pm 0.2$  conventional units (CU), which confirms the idea of an increase in the influence on the autonomic nervous system. The value for normotonics is  $2.2 \pm 0.1$  CU. This group was characterized by the balance between the sympathetic and parasympathetic parts of the autonomic nervous system. In sympathicotonicity –  $1.9 \pm 0.5$  CU, which confirms the idea of increasing the influence of the sympathetic division of the autonomic nervous system. In hypersympathicotonicity –  $1.1 \pm 0.4$  CU. To ensure adequate functioning of the cardiovascular system and for normal adaptation to physical exertion in students, it is necessary to form a level of motor activity that quantitatively corresponds to a coefficient of physical activity of at least 1.75.

**Key words:** electrocardiogram, cardiovascular system, stress index, initial vegetative tone, physical activity coefficient

**Author contributions:** concept and design of the study, discussion of the results – A.S. Emelyanova; planning and execution of the experimental part of the study – E.E. Stepura; discussion of the results, design of the introduction and formulation of the conclusion – L.A. Simonyan.

**Conflict of interest statement.** The authors stated that there was no conflict of interest.

Received 26.01.2021. Accepted 11.02.2021.

**For citation:** Emelyanova AS, Simonyan LA, Stepura EE. Heart rate variability analysis of students with different motor activity levels. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):127—135. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-127-135

### Введение

При физических нагрузках происходит развитие функциональных резервов организма и его адаптация, а уровень двигательной активности определяет их количественный эквивалент [1—7]. В научных статьях авторов Доронцева А.В. и Козлятникова О.А. отмечается, что имеется взаимосвязь между такими

показателями, как физическое развитие и физическая подготовленность организма студентов [8—12]. При физических нагрузках наблюдается изменение функциональных систем, изменение адаптивно-регуляторных систем, предопределяя дальнейший ход адаптации организма. На функциональные резервы организма влияет не только тренировочная деятельность,

но и учебная нагрузка, что предъявляет повышенные требования к состоянию здоровья студентов [13—19].

*Цель научной работы* – провести анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) у студентов с учетом уровня двигательной активности.

Задачи данной работы заключаются в следующем:

- 1) провести регистрацию ЭКГ у студентов с разным коэффициентом физической активности (КФА);
- 2) провести математический анализ ВСР студентов с разным коэффициентом физической активности с помощью современной комплексной электрофизиологической лаборатории «CONAN – 4.5»;
- 3) установить исходный вегетативный тонус на основе индекса напряжения у студентов с разным КФА;
- 4) проанализировать полученные числовые значения первичных показателей ВСР – мода, амплитуда моды и вариационный размах – и частоту сердечных сокращений, полученных на основе обработки электрокардиограммы;
- 5) проанализировать триангулярный индекс ВСР студентов с разным КФА;
- 6) определить взаимосвязь КФА и показателей ВСР.

## Материалы и методы

Регистрацию частоты сердечных сокращений и ЭКГ проводили в покое у 100 студентов (31 девушка и 69 юношей, в возрасте от 18 до 22 лет). У всех участников исследования было получено информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных.

Все эксперименты проведены с соблюдением принципов биоэтики. Запись ЭКГ проводилась

с помощью комплексной электрофизиологической лаборатории «CONAN – 4.5» с протоколированием показателей вариабельности сердечного ритма, рассчитанных по электрокардиограмме, с последующей компьютерной обработкой данных в Microsoft Excel 2007, программный пакет для статистического анализа Statistica10. Статистически значимыми считали  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Полученные электрокардиограммы были математически проанализированы. В ходе математического анализа были получены индексы напряжения каждого обследуемого студента. Для разделения индекса напряжения на группы мы воспользовались градацией числовых значений авторов Ширяева О.Ю. и Ивлевой Е.И. Они считали, что при стрессе или каких-либо заболеваниях значение показателя индекса напряжения возрастает. В своих исследованиях авторы выделили пять типов исходного вегетативного тонуса: ваготонический, нормотонический, симпатикотонический, сверхсимпатикотонический и запредельный сверхсимпатикотонический. В проведенных наших исследованиях все студенты были здоровые, и запредельный сверхсимпатикотонический тонус не был выявлен ни у одного студента (значение запредельного сверхсимпатикотонического тонуса составляет более 600 у.е.).

В результате проведенных исследований студенты были разделены на 4 группы, каждой группе соответствовал свой индекс напряжения (ИН) и предполагаемый исходный вегетативный тонус (ИВТ). Полученные соотношения индекса напряжения и предполагаемого исходного тонуса и количество исследуемых студентов, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Соотношение студентов на основе исходного вегетативного статуса

Индекс напряжения, у.е.	ИВТ по ИН	Количество обследуемых
≤30	Ваготония / vagotonia	10
31–120	Нормотония / normotonia	22
121–300	Симпатикотония / sympathicotonia	63
≥301	Гиперсимпатикотония / hypersympathicotonia	5

При анализе электрокардиограммы с помощью современной комплексной электрофизиологической лаборатории «CONAN – 4.5» была установлена ча-

стота сердечных сокращений у студентов с разным исходным вегетативным статусом, полученные числовые значения представлены в таблице 2.

Таблица 2

## Частота сердечных сокращений студентов с разной вегетативной регуляцией

№	ИН, у.е.	ИВТ по ИН	ЧСС, уд/мин	Вид изменения ритма / отсутствие нарушения ритма
1	≤30	Ваготония	65 ± 0,13	Умеренная нормокардия
2	31–120	Нормотония	70 ± 0,21	Нормокардия
3	121–300	Симпатикотония	73 ± 0,16	Нормокардия
4	≥ 301	Гиперсимпатикотония	80 ± 0,27	Тахикардия

Примечание: достоверность различий ЧСС оценивалась между группами с применением t-критерия Стьюдента,  $p < 0,001$

При анализе таблицы 1 первая группа студентов (в количестве 10 человек) с ИН регуляторных систем до 30 у.е. с предполагаемым ИВТ – «ваготония» – характеризовалась преобладанием парасимпатической ВНС. В состоянии покоя у обследуемой группы частота сердечных сокращений –  $65 \pm 0,13$  уд/мин ( $p < 0,001$ ) – наблюдается умеренная нормокардия.

Во вторую исследуемую группу студентов (22 человека) с разным уровнем двигательной активности с ИН от 31 до 120 у.е. с предполагаемым ИВТ – «нормотония» – характеризовалась равновесным состоянием ВНС между парасимпатическим и симпатическим отделом, что свидетельствовало о активности парасимпатического отдела нервной системы. Частота сердечных сокращений составила  $70 \pm 0,21$  уд/мин ( $p < 0,001$ ) – нормокардия.

Третья группа студентов (63 человека) характеризовалась преобладанием симпатической ВНС с ИН

от 121 до 300 у.е. с предполагаемым ИВТ – «симпатикотония». Частота сердечных сокращений по сравнению с предыдущими группами больше на 8 и 3 уд/мин соответственно ваготония и нормотония и составила –  $73 \pm 0,16$  уд/мин ( $p < 0,001$ ) – нормокардия.

Для четвертой группы студентов (5 человек) характерно повышение показателя деятельности симпатической ВНС с ИН  $\geq 301$  у.е., с предполагаемым ИВТ – «сверхсимпатикотония». Частота сердечных сокращений составил  $80 \pm 0,27$  уд/мин ( $p < 0,001$ ), вид аритмии – тахикардия.

При анализе электрокардиограммы с помощью современной комплексной электрофизиологической лаборатории «CONAN – 4.5» были получены и проанализированы числовые значения показателей variability сердечного ритма у студентов с разным исходным вегетативным статусом, полученные значения представлены в таблицах 3, 4, 5.

Таблица 3

## Значение моды (Mo) variability сердечного ритма студентов

№	ИН, у.е.	ИВТ по ИН	Достоверность между группами	Mo, сек
1	≤ 30	Ваготония	1–3 ( $p < 0,001$ ) 1–2 ( $p < 0,001$ ) 1–4 ( $p < 0,001$ )	0,881±0,01
2	31–120	Нормотония	2–3 ( $p < 0,001$ ) 2–4 ( $p < 0,001$ )	0,821±0,01
3	121–300	Симпатикотония	3–4 ( $p < 0,01$ )	0,792±0,01
4	≥ 301	Гиперсимпатикотония		0,763±0,01

Примечание: достоверность различий Mo оценивалась между группами с применением t-критерия Стьюдента

Анализ таблиц 3, 4, 5 показал следующую физиологическую картину первичных показателей variability сердечного ритма у студентов, с разным исходным вегетативным статусом.

Анализ таблиц 3, 4, 5 показал следующую физиологическую картину первичных показателей variability сердечного ритма у студентов с разным исходным вегетативным статусом.

Мода – это диапазон значений наиболее часто встречающихся R-R-интервалов. У гиперсимпатикотоников составило  $0,763 \pm 0,01$  сек ( $p < 0,05$ ) – характеризовалась наименьшим значением часто встречающегося кардиоинтервала среди остальных обследованных групп.

У группы ваготоников парасимпатический отдел преобладает над симпатическим отделом ВНС, значение данного показателя –  $0,881 \pm 0,1$  сек ( $p < 0,05$ ). Наблюдается наименьшее значение ЧСС у студентов среди всего исследуемого массива.

Значение данного показателя у нормотоников составило  $0,821 \pm 0,1$  сек ( $p < 0,05$ ) – характеризовались равновесным состоянием вегетативной нервной

системы между парасимпатическим и симпатическим отделом, что свидетельствовало о тоне парасимпатического отдела ВНС.

Группа симпатикотоников, которая характеризовалась смещением вегетативного баланса в сторону симпатической вегетативной нервной системы –  $0,792 \pm 0,1$  сек ( $p < 0,05$ ).

Число кардиоинтервалов, которые соответствуют значению показателя моды, характеризует амплитуду моды. На преобладание автономного контура регуляции указывают низкие показатели данного параметра, на активность центрального контура регуляции – высокие значения.

Таблица 4

Значение амплитуды моды (АМо) variability сердечного ритма студентов

№	ИН, у.е	ИВТ по ИН	Достоверность между группами	АМо, %
1	$\leq 30$	Ваготония	1–2 ( $p < 0,05$ )	$40,3 \pm 1,2$
2	31–120	Нормотония	1–3 ( $p < 0,001$ )	$45,2 \pm 2,1$
3	121–300	Симпатикотония	1–4 ( $p < 0,001$ )	$52,4 \pm 3,5$
4	$\geq 301$	Гиперсимпатикотония	2–4 ( $p < 0,001$ ) 3–4 ( $p < 0,001$ )	$89,3 \pm 8,4$

Примечание: достоверность различий АМо оценивалась между группами с применением t-критерия Стьюдента

Данные таблицы 4 свидетельствуют о том, что наибольшее значение данного показателя наблюдается у гиперсимпатикотоников –  $89,3 \pm 8,4$  % ( $p < 0,01$ ), таким образом в процессе включается центральный контур регуляции.

Для группы обследуемых с ИВТ ваготония анализируемый показатель составил  $40,3 \pm 4,2$  % ( $p < 0,05$ ), а у группы обследуемых с ИВТ нормотония и симпатикотония –  $45,2 \pm 2,1$  % ( $p < 0,001$ ) и  $52,4 \pm 3,5$  % ( $p < 0,001$ ) соответственно. При анализе исследуемого показателя, низкие указывают на преобладание автономного контура регуляции.

У исследуемой группы с ИВТ ваготония анализ вариационного показателя –  $0,651 \pm 0,02$  сек ( $p < 0,05$ ), свидетельствует о снижении сократительных функций миокарда и преобладании ваготонического тонуса.

Данное значение анализируемого показателя в группе нормотоников составило  $0,323 \pm 0,07$  сек ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о тоне парасимпатического отдела нервной системы.

У обследуемых групп – симпатикотоников и гиперсимпатикотоников наименьшие показатели вариационного размаха –  $0,222 \pm 0,04$  сек ( $p < 0,05$ ) и  $0,121 \pm 0,06$  сек ( $p < 0,05$ ) соответственно. Это является следствием преобладания недыхательного компонента сердечного ритма и парасимпатического звена. Следовательно, для таких групп студентов характерна низкая адаптационная возможность, что может характеризоваться низкими показателями уровня врожденных резервов.

Таблица 5

Значение вариационного размаха (ΔX) variability сердечного ритма студентов с разным вегетативным статусом

№	ИН, у.е.	ИВТ по ИН	Достоверность между группами	ΔX, сек
1	$\leq 30$	Ваготония	1–2 ( $p < 0,001$ )	$0,651 \pm 0,02$
2	31–120	Нормотония	1–3 ( $p < 0,001$ )	$0,323 \pm 0,07$
3	121–300	Симпатикотония	1–4 ( $p < 0,001$ ) 2–3 ( $p < 0,001$ )	$0,222 \pm 0,04$
4	$\geq 301$	Гиперсимпатикотония	2–4 ( $p < 0,001$ ) 3–4 ( $p < 0,001$ )	$0,121 \pm 0,06$

Примечание: достоверность различий ΔX оценивалась между группами с применением t-критерия Стьюдента

При анализе электрокардиограммы с помощью современной комплексной электрофизиологической лаборатории «CONAN – 4.5», были получены и проанализированы значения триангулярного индекса

(TiNN) вариабельности сердечного ритма у студентов, с разным исходным вегетативным статусом, полученные числовые значения данного показателя представлены в таблице 6.

Таблица 6

## Показатели триангулярного индекса (TiNN) вариабельности сердечного ритма студентов с разным вегетативным статусом

№	ИН, у.е.	ИВТ по ИН	Достоверность между группами	TiNN у.е.
1	≤ 30	Ваготония	1–2 (p<0,05) 1–3 (p<0,05) 1–4 (p<0,001) 2–4 (p<0,05)	2,5±0,1
2	31–120	Нормотония		2,2±0,1
3	121–300	Симпатикотония		1,9±0,2
4	≥ 301	Гиперсимпатикотония		1,1±0,4

Примечание: достоверность различий TiNN оценивалась между группами с применением t-критерия Стьюдента

Для ваготоников, у которых парасимпатический отдел преобладает над симпатическим отделом ВНС, значение триангулярного индекса составило 2,5±0,1 у.е. (p<0,05), число сердечных сокращений уменьшается по сравнению с нормотониками, симпатикотониками и гиперсимпатикотониками. Это подтверждает представление о повышении влияния парасимпатического отдела вегетативной нервной системы.

Значение триангулярного индекса у нормотоников составило 2,2±0,1 у.е. (p<0,05). Данная группа характеризовалась равновесным состоянием вегетативной нервной системы между парасимпатическим и симпатическим отделом, что свидетельствовало о тоне парасимпатического отдела нервной системы.

У симпатикотоников, которые характеризовались преобладанием симпатического отдела вегетативной нервной системы, показатель данного значения составил 1,9±0,2 у.е. (p<0,05). Это подтверждает представление о повышении влияния симпатического отдела вегетативной нервной системы.

У гиперсимпатикотоников значение триангулярного индекса составило 1,1±0,4 у.е. (p<0,05). Для данной группы студентов характерно уменьшение

наиболее часто встречающего кардиоинтервала среди всего массива.

Студентам был предложен тест для определения коэффициента физической активности. Коэффициент физической активности – это отношение среднесуточных затрат энергии человека к затратам энергии в состоянии покоя, к так называемой величине основного обмена.

В таблице 7 представлены значения коэффициента физической активности у студентов с разным исходным вегетативным статусом.

В первую группу вошли студенты с ИН до 30 у.е. с исходным вегетативным статусом «ваготония». Такая группа характеризовалась преобладанием парасимпатической вегетативной нервной системы. Коэффициент физической активности составил 1,41±0,1 баллов.

В первую группу вошли студенты с ИН до 30 у.е. с исходным вегетативным статусом «ваготония». Такая группа характеризовалась преобладанием парасимпатической вегетативной нервной системы. Коэффициент физической активности составил 1,41±0,1 баллов.

Таблица 7

## Показатели коэффициента физической активности (КФА) у студентов с разным вегетативным статусом

№	ИН, у.е.	ИВТ по ИН	Достоверность между группами	КФА, баллы
1	≤ 30	Ваготония	1–2 (p<0,05) 1–3 (p<0,001) 1–4 (p<0,001) 2–3 (p<0,001) 2–4 (p<0,001) 3–4 (p<0,001)	1,41±0,1
2	31–120	Нормотония		1,73±0,1
3	121–300	Симпатикотония		2,01±0,1
4	≥ 301	Гиперсимпатикотония		2,42±0,2

Примечание: достоверность различий КФА оценивалась между группами с применением t-критерия Стьюдента

В первую группу вошли студенты с ИН до 30 у.е. с исходным вегетативным тонусом «ваготония». Такая группа характеризовалась преобладанием парасимпатической вегетативной нервной системы. Коэффициент физической активности составил  $1,41 \pm 0,1$  баллов.

Вторая группа с индексом напряжения от 31 до 120 у.е. с предполагаемым исходным вегетативным тонусом «нормотония». Такая группа характеризовалась равновесным состоянием вегетативной нервной системы между парасимпатическим и симпатическим отделами. Коэффициент физической активности составил в данной группе студентов  $1,73 \pm 0,1$  баллов.

Третья группа характеризовалась преобладанием симпатической вегетативной нервной системы с индексом напряжения от 121 до 300 у.е. с исходным вегетативным тонусом «симпатикотония». Для данной группы коэффициент физической активности составил  $2,01 \pm 0,1$  баллов.

Четвертая группа характеризовалась значительным повышением показателей деятельности симпатической вегетативной нервной системы с индексом напряжения более 301 у.е., с исходным вегетативным тонусом «сверхсимпатикотония». Коэффициент физической активности составил  $2,42 \pm 0,2$  баллов.

Выявлено, что среди всего изученного массива студентов (при дифференцировании исходного вегетативного тонуса, рассчитанного по индексу напряжения) «нормотоники» характеризовались оптимальным соотношением между парасимпатическим и симпатическим отделами вегетативной нервной системы. При этом значение коэффициента физической активности у исследованных данной группы определялся на уровне значений  $1,73 \pm 0,1$  баллов. Таким образом, для обеспечения адекватного функционирования сердечно-сосудистой системы и для нормальной адаптации к физическим нагрузкам у студентов необходимо формировать уровень двигательной активности, количественно соответствующий коэффициенту физической активности не ниже 1,75 баллов.

### Выводы

В ходе регистрации и математического анализа variability сердечного ритма у студентов с помощью современной комплексной электрофизио-

логической лаборатории «CONAN – 4.5» пришли к следующим выводам.

1. В результате исследований испытуемые студенты разделились на четыре подгруппы: в первую подгруппу с исходным вегетативным тонусом ваготония вошли 10 человек, во вторую с предполагаемым исходным вегетативным тонусом – нормотония – 22 студента, в третью подгруппу с исходным вегетативным тонусом – симпатикотония – 63 студента, а в четвертую с исходным вегетативным тонусом – гиперсимпатикотония – 5 человек.

2. Значение моды у гиперсимпатикотоников –  $0,76 \pm 0,01$  сек. Для ваготоников, у которых преобладает парасимпатический отдел, значение составило  $0,88 \pm 0,1$  сек. У нормотоников оно составило  $0,82 \pm 0,1$  сек – наблюдается равновесие в вегетативном статусе ВНС. У симпатикотоников –  $0,79 \pm 0,1$  сек.

3. Наибольшее значение показателя АМо характерно для исследуемой группы – гиперсимпатикотоников –  $89,3 \pm 8,4$  %. Наименьшее значение для ваготоников –  $40,3 \pm 4,2$  %, а промежуточные значения составили у групп нормотоников и симпатикотоников –  $45,2 \pm 2,1$  % и  $52,4 \pm 3,5$  % соответственно.

4. У исследуемой группы ваготоников вариационный размах –  $0,651 \pm 0,02$  сек, преобладает ваготонический тонус. Нормотоники –  $0,323 \pm 0,07$  сек, что свидетельствует о тоне ПО ВНС и преобладанием дыхательных изменений сердечного ритма. У групп – симпатикотоников и гиперсимпатикотоников составило  $0,222 \pm 0,04$  сек и  $0,121 \pm 0,06$  сек соответственно.

5. Для ваготоников значение треугольного индекса составляло  $2,5 \pm 0,2$  у.е., что подтверждает представление о повышении влияния ПО ВНС. Значение у нормотоников –  $2,2 \pm 0,1$  у.е. Данная группа характеризовалась равновесием между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы. У симпатикотоников –  $1,9 \pm 0,5$  у.е., что подтверждает представление о повышении влияния симпатического отдела вегетативной нервной системы. У гиперсимпатикотоников –  $1,1 \pm 0,4$  у.е.

6. Для обеспечения адекватного функционирования сердечно-сосудистой системы и для нормальной адаптации к физическим нагрузкам у студентов необходимо формировать уровень двигательной активности, количественно соответствующий коэффициенту физической активности не ниже 1,75.

## Библиографический список

1. Агаджанян Н.А., Баевский Р.М., Берсенева А.П. Проблемы адаптации и учение о здоровье. М.: РУДН, 2006. С. 281-290.
2. Баевский Р.М., Иванов Г.Г. Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2015. № 2. С. 108.
3. Баевский Р.М. Анализ вариабельности сердечного ритма: история и философия, теория и практика // Клиническая информатика и телемедицина. 2004. № 1. С. 54–64.
4. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин И.В. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиологических систем // Вестник аритмологии. 2001. № 24. С. 15–20.
5. Бондарев С.А. Облачные технологии регистрации ЭКГ в тренировочном цикле и профилактике внезапной смерти спортсмена // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 24-25.
6. Бондарев С.А. Применение облачных технологий регистрации ЭКГ для контроля сердечной деятельности спортсменов // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2016. Т. 11. № 2. С. 517–519.
7. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных. М., 2007. 640 с.
8. Макаров Л.М., Комолятова В.Н., Киселева И.И. Особенности ЭКГ у молодых спортсменов уровня высшего спортивного мастерства // Прикладная спортивная наука. 2015. № 2. С. 108–114.
9. Судakov К.В. Информационный принцип в физиологии: анализ с позиций общей теории функциональных систем // Успехи физиологических наук. 1995. Т. 26 № 4. С. 3–27.
10. Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Ивануцкий А.В. Функциональная диагностика в кардиологии. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2005. С. 700.
11. Голухова Е.З. Неинвазивная аритмология. М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2002. С. 200.
12. Akselrod S., Gordon D., Ubel F.A. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: A quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control // Science. 1999. Vol. 213. P. 220–222.
13. Algra A., Tijssen J.G., Roelandt J.R. Contribution of the 24 hour electrocardiogram to the prediction of sudden coronary death // Br. Heart J 2003. Vol. 70. P. 421–427.
14. Algra A., Tijssen J.G., Roelandt J.R. Heart rate variability from 24-hour electrocardiography and the 2-year risk for sudden death // Circulation. 1998. Vol. 88. № 1. P. 180–185.
15. Barutcu I., Esen A.M., Kaya D. Cigarette smoking and heart rate variability: Dynamic influence of parasympathetic and sympathetic maneuvers // Ann. Noninvasive Electrocardiol. 2005. Vol. 10. P. 324–329.
16. Berger R.D., Saul J.P., Cohen R.J. Assessment of autonomic response by broad-band respiration // Trans. Biomed. Eng. 1999. Vol. 36. P. 1061–1065.
17. Bigger J.T., Fleiss J.L., Steinman R.C. RR variability in healthy, middle-aged persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction // Circulation. 1995. Vol. 91. P. 1936–1943.
18. Bigger J.T., Fleiss J.L., Kleiger R. The Multicenter Post-infarction Research Group: The relationship among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in 2 years after myocardial infarction // Ibid. 1984. Vol. 69. P. 250-257.
19. Bigger J.T., Fleiss J.L., Rolnitzky L.M. Stability over time of

heart period variability in patients with previous myocardial infarction and ventricular arrhythmias // Cardiol. 1992. Vol. 69. P. 718–723.

## References

1. Agadzhanian NA, Baevsky RM, Berseneva AP. *Problems of adaptation and the doctrine of health*. Moscow. Publishing house RUDN. 2006;281-290. (In Russ).
2. Baevsky RM, Ivanov GG. Heart rate variability: theoretical aspects and clinical application possibilities. *Ultrasound and functional diagnostics*. 2015;2:108. (In Russ).
3. Baevsky RM. Analysis of heart rate variability: history and philosophy, theory and practice. *Clinical Informatics and telemedicine*. 2004;1:54–64. (In Russ).
4. Baevsky RM, Ivanov GG, Chireikin IV. Analysis of heart rate variability in the use of various electrocardiological systems. *Bulletin of Arrhythmology*. 2001;24: 15-20. (In Russ).
5. Bondarev SA. Cloud technologies of ECG registration in the training cycle and prevention of sudden death of an athlete. *Materials of the III All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. 2016;24-25. (In Russ).
6. Bondarev SA. Application of cloud technologies for ECG registration for monitoring the cardiac activity of athletes. *Health - the basis of human potential: problems and ways to solve them*. 2016;11(2):517-519. (In Russ).
7. Kulaichev AP. *Methods and means of complex data analysis*. M. 2007;640. (In Russ).
8. Makarov LM, Komolyatova VN, Kiseleva II. Features of ECG in young athletes of the highest sports skill level. *Applied sports science*. 2015;2:108-114. (In Russ).
9. Sudakov KV. Information principle in physiology: analysis from the standpoint of the general theory of functional systems. *Advances in physiological sciences*. 1995;26(4):3-27. (In Russ).
10. Bockeria LA, Golukhova EZ, Ivanitsky AV. *Functional diagnostics in cardiology*. M.: Bakulev them. A. N. After Bakulev RAMS. 2005;700.
11. Golukhova EZ. *Non-invasive Arrhythmology*. M.: Bakulev Them. RAMS. 2002. 200. (In Russ).
12. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: A quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*. 1999;213:220–222.
13. Algra A, Tijssen JG, Roelandt JR. Contribution of the 24 hour electrocardiogram to the prediction of sudden coronary death. *Br. Heart J*. 2003;70:421–427.
14. Algra A, Tijssen JG, Roelandt JR. Heart rate variability from 24-hour electrocardiography and the 2-year risk for sudden death. *Circulation*. 1998;88(1): 180–185.
15. Barutcu I, Esen AM, Kaya D. Cigarette smoking and heart rate variability: Dynamic influence of parasympathetic and sympathetic maneuvers. *Ann. Noninvasive Electrocardiol*. 2005;10:324–329.
16. Berger RD, Saul JP, Cohen RJ. Assessment of autonomic response by broad-band respiration. *Trans. Biomed. Eng*. 1999;36:1061–1065.
17. Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC. RR variability in healthy, middle-aged persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995;91:1936–1943.

18. Bigger JT, Fleiss JL, Kleiger R. The Multicenter Postinfarction Research Group: The relationship among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in 2 years after myocardial infarction. *Ibid.* 1984;69: 250-257.

19. Bigger JT, Fleiss JL, Rolnitzky LM. Stability over time of heart period variability in patients with previous myocardial infarction and ventricular arrhythmias. *The CAPS and ESSEM investigators. Am. J. Cardiol.* 1992;69:718–723.

*Corresponding author:* Stepura Evgeny Evgenievich – PhD of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Medical and Biological Disciplines State Educational Institution of Higher Education of the Moscow Region «State Social and Humanitarian University», 140411, Zelenaya str., 30, Kolomna, Russia. E-mail: chimik89@mail.ru

Emelyanova A. S. ORCID: 0000–0002–0622–8626

Simonyan L. A.: ORCID: 0000–0002–5596–294X

Stepura E. E. SPIN: ORCID: 0000–0002–0554–6331

*Ответственный за переписку:* Степура Евгений Евгеньевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин Государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный социально-гуманитарный университет», Россия, 140411, г. Коломна, ул. Зеленая, д. 30. E-mail: chimik89@mail.ru

Емельянова А. С. SPIN: 3024–8527; ORCID: 0000–0002–0622–8626

Симонян Л. А.: SPIN: 3343–9019; ORCID: 0000–0002–5596–294X

Степура Е. Е. SPIN: 2786–1539; ORCID: 0000–0002–0554–6331

DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-136-146

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ  
RESEARCH ARTICLE

## Функциональное взаимодействие жевательной мускулатуры у детей с аномалиями зубочелюстной системы

И.В. Косолапова<sup>1</sup>, Е.В. Дорохов<sup>1</sup>, М.Э. Коваленко<sup>1</sup>, Р.В. Лесников<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, г. Воронеж, Российская Федерация

<sup>2</sup>БУЗ ВО «Воронежская детская клиническая стоматологическая поликлиника № 2»,

г. Воронеж, Российская Федерация

\* irencherry@yandex.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Современное стоматологическое лечение направлено не только на устранение эстетических, но и функциональных нарушений, и требует понимания функциональной сопряженности жевательных мышц, возможности прогнозирования параметров. Цель исследования: оценить функциональные взаимоотношения между тонусом собственно жевательных мышц и биоэлектрической активностью височных и подъязычной группы мышц у детей с аномалиями зубочелюстной системы. *Материалы и методы.* В исследовании приняли участие 36 пациентов Детской клинической стоматологической поликлиники № 2 г. Воронежа в возрасте от 6 до 12 лет, не получавшие ранее ортодонтическое лечение и имеющие дистальные аномалии окклюзии. Оценка биоэлектрической активности височных и подъязычной группы мышц была проведена при помощи поверхностной электромиографии на аппарате «Электромиограф стоматологический» (г. Таганрог, Россия), проба «Жевание общее». Оценка тонуса собственно жевательных мышц проводилась при помощи прибора «Миотон-ЗС» в состоянии физиологического покоя нижней челюсти. Статистическая обработка проводилась с применением Microsoft Excel, версия 7.0 и статистических программ SPSS Statistics 21 и STATISTICA 7. *Результаты и обсуждение.* Корреляционный анализ позволил обнаружить наличие 4 слабых положительных, 2 слабых отрицательных, 14 умеренных положительных, 3 умеренных отрицательных и 1 заметной положительной корреляционных связей между тонусом правой собственно жевательной мышцы и параметрами биоэлектрической активности правых и левых височных и подъязычных мышц. Корреляционный анализ позволил обнаружить наличие 5 слабых положительных, 7 слабых отрицательных, 9 умеренных отрицательных корреляционных связей между тонусом левой собственно жевательной мышцы и параметрами биоэлектрической активности правых и левых височных и подъязычных мышц. *Выводы.* Обнаружено большее влияние тонуса правой собственно жевательной мышцы на показатели биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц по сравнению с тонусом левой собственно жевательной мышцы. Выведено 27 уравнений, которые могут быть использованы в качестве прогностических моделей расчета тонуса правых и левых собственно жевательных мышц в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц.

**Ключевые слова:** поверхностная электромиография, миотонометрия, аномалии зубочелюстной системы

**Вклад авторов.** Косолапова И.В. — сбор и обработка материалов, написание текста; Дорохов Е.В. — дизайн исследования, написание текста; Коваленко М.Э. — анализ полученных данных, написание текста; Р.В. Лесников — написание текста.

© Косолапова И.В., Дорохов Е.В., Коваленко М.Э., Лесников Р.В., 2021



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

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

Поступила 14.01.2021. Принята 15.02.2021.

**Для цитирования:** *Косолапова И.В., Дорохов Е.В., Коваленко М.Э., Лесников Р.В.* Функциональное взаимодействие жевательной мускулатуры у детей с аномалиями зубочелюстной системы // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2021. Т. 25. № 2. С. 136—146. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-136-146

## Functional interaction of chewing muscles in children with dentoalveolar system anomalies

I.V. Kosolapova<sup>1\*</sup>, E.V. Dorokhov<sup>1</sup>, M.E. Kovalenko<sup>1</sup>, R.V. Lesnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

<sup>2</sup>Budget Healthcare Institution of Voronezh region «Children's Dental Clinic № 2», Voronezh, Russian Federation

\*Corresponding author: irenecherry@yandex.ru

**Annotation. Relevance.** The focus of modern dental treatment not only on the elimination of aesthetic, but also functional disorders requires an understanding of the functional conjugation of the chewing muscles, the possibility of interprognosis of parameters. **Objective.** Assess the functional relationship between the tone of the chewing muscles proper and the bioelectric activity of the temporal and sublingual muscle groups in children with anomalies of the dentoalveolar system. **Materials and Methods.** The study involved 36 patients of Children's Clinical Dental Clinic No. 2 of Voronezh, aged 6 to 12 years, who had not previously received orthodontic treatment and had distal occlusion anomalies. Evaluation of the bioelectric activity of temporal and sublingual muscles was carried out using surface electromyography on the Electromyograph Dental apparatus (Taganrog, Russia), the Chewing General sample. Evaluation of the tone of the chewing muscles proper was carried out using the Mioton-3C device in a state of physiological rest of the lower jaw. Statistical processing was carried out using Microsoft Excel, version 7.0 and the statistical programs SPSS Statistics 21 and STATISTICA 7. **Results and Discussion.** Correlation analysis revealed the presence of 4 weak positive, 2 weak negative, 14 moderate positive, 3 moderate negative, and 1 noticeable positive correlation between the tone of the right chewing muscle proper and the parameters of the bioelectric activity of the right and left temporal and sublingual muscles. Correlation analysis revealed the presence of 5 weak positive, 7 weak negative, 9 moderate negative correlations between the tone of the left chewing muscle proper and the parameters of bioelectric activity of the right and left temporal and sublingual muscles. **Conclusion.** A greater effect of the tone of the right chewing muscle on the bioelectric activity of temporal and sublingual muscles was found compared to the tone of the left chewing muscle itself. 27 equations have been derived that can be used as predictive models for calculating the tone of right and left chewing muscles proper depending on the indicators of bioelectric activity of temporal and sublingual muscles.

**Key words:** surface electromyography, myotonometry, anomalies of the dentoalveolar system

**Author contributions:** Kosolapova I.V.— data collection and processing, writing text; Dorokhov E.V.— study design, writing text; Kovalenko M.E.— analysis of data, writing text; R.V. Lesnikov — writing text.

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

Received 14.01.2021. Accepted 15.02.2021.

**For citation:** Kosolapova IV, Dorokhov EV, Kovalenko ME, Lesnikov RV. Functional interaction of chewing muscles in children with dentoalveolar system anomalies. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):136—146. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-136-146

## Введение

Стоматологическое лечение помимо решения эстетических проблем зубочелюстной системы для достижения стабильного результата неразрывно связано с обнаружением и устранением функциональных нарушений ее деятельности. Челюстно-лицевая область является системой, элементы которой представляют собой целостный аппарат, и нарушение в одном из них приводит к изменению работы всего комплекса [1]. Потому обнаружение функциональных нарушений и их взаимосвязи является актуальной проблемой современной стоматологии.

Поверхностная электромиография является методом функционального исследования мышечной системы на основе графической регистрации биопотенциалов мышц. Она является неинвазивной методикой, что позволяет широко применять ее для обследования детей на стоматологическом приеме [2, 3]. Еще одним неинвазивным и популярным методом исследования жевательных мышц является миоэлектродия, которая позволяет определять их тонус в различных состояниях [4]. Комбинация этих методов диагностики для исследования одних и тех же мышц является часто применяемой в российских и зарубежных исследованиях [5—7]. Однако использование их для различных мышц челюстно-лицевой системы, обнаружение взаимосвязи между полученными данными и их причиной, возможность прогнозирования одних функциональных параметров, зная результаты других, являются малоизученными и актуальными направлениями современной стоматологии.

Цель исследования: оценить функциональные взаимоотношения между тонусом собственно жевательных мышц и биоэлектрической активностью височных и подъязычной группы мышц у детей с аномалиями зубочелюстной системы.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 36 пациентов Детской клинической стоматологической поликлиники № 2 г. Воронежа в возрасте от 6 до 12 лет не получавшие ранее ортодонтическое лечение

и имеющие дистальные аномалии окклюзии. У родителей или опекунов всех пациентов было получено информированное согласие на участие их детей в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных. Программа исследований была одобрена этическим комитетом ВГМУ им. Н.Н. Бурденко (протокол № 2 от 30 октября 2018 г., заседание состоялось по адресу: г. Воронеж, ул. Студенческая, 10).

На подготовительном этапе пациенты и их родители были ознакомлены с целью и детальным описанием процедуры исследования. Оценка биоэлектрической активности височных и подъязычной группы мышц была проведена при помощи поверхностной электромиографии на аппарате «Электромиограф стоматологический» (г. Таганрог, Россия). Испытуемый находился в стоматологическом кресле в спокойном состоянии, на предварительно обезжиренные участки кожи, соответствующие проекциям наибольшего напряжения височных и подъязычных мышц, накладывались одноразовые электроды, заземляющие датчики располагались на лбу и запястье испытуемого [8]. Далее пациенту предлагалось на протяжении 30 секунд пережевывать 2 ядра фундука, массой 0,8 г с одновременной записью биоэлектрической активности мышц (проба «Жевание общее») [9]. Результаты исследования выводились на экран компьютера и автоматически обрабатывались для получения числовых параметров биоэлектрической активности правой височной мышцы (*m. temporalis D*), левой височной мышцы (*m. temporalis S*), правой подъязычной мышцы (*m. mylohyoideus D*) и левой подъязычной мышцы (*m. mylohyoideus S*).

Оценка тонуса собственно жевательных мышц проводилась при помощи прибора «Миотон-3С» в состоянии физиологического покоя нижней челюсти [10]. Учитывался тонус правой собственно жевательной мышцы (*m. masseter D*) и левой собственно жевательной мышцы (*m. masseter S*).

Статистическая обработка проводилась с применением Microsoft Excel, версия 7.0, и статистических программ SPSS Statistics 21 и STATISTICA 7.

Используемые методы: t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча, U-критерий Манна — Уитни, критерий Хи-квадрат Пирсона, определение тесноты связи по шкале Чеддока, метод парной линейной регрессии.

## Результаты и обсуждение

Был выполнен анализ тонуса *m. masseter* (D) в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц (Табл. 1).

Таблица 1

Анализ тонуса *m. masseter* (D) в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	rxу	Теснота связи по шкале Чеддока	p
<i>M. temporalis</i> (D), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,131	Слабая	0,655
<i>M. temporalis</i> (D), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,017	Нет связи	0,955
<i>M. temporalis</i> (D), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,133	Слабая	0,651
<i>M. temporalis</i> (D), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,366	Умеренная	0,198
<i>M. temporalis</i> (D), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,351	Умеренная	0,218
<i>M. temporalis</i> (D), время жевания/ покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,392	Умеренная	0,166
<i>M. temporalis</i> (D), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,401	Умеренная	0,156
<i>M. mylohyoideus</i> (D), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,392	Умеренная	0,166
<i>M. mylohyoideus</i> (D), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,442	Умеренная	0,114
<i>M. mylohyoideus</i> (D), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,351	Умеренная	0,218
<i>M. mylohyoideus</i> (D), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,245	Слабая	0,399
<i>M. mylohyoideus</i> (D), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,215	Слабая	0,46
<i>M. mylohyoideus</i> (D), время жевания/ покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,201	Слабая	0,49
<i>M. mylohyoideus</i> (D), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,313	Умеренная	0,275
<i>M. temporalis</i> (S), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,355	Умеренная	0,213
<i>M. temporalis</i> (S), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,365	Умеренная	0,2
<i>M. temporalis</i> (S), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,513	Заметная	0,06
<i>M. temporalis</i> (S), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,435	Умеренная	0,12
<i>M. temporalis</i> (S), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,393	Умеренная	0,165
<i>M. temporalis</i> (S), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,453	Умеренная	0,103
<i>M. mylohyoideus</i> (S), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,032	Нет связи	0,912
<i>M. mylohyoideus</i> (S), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,023	Нет связи	0,939
<i>M. mylohyoideus</i> (S), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,141	Слабая	0,63
<i>M. mylohyoideus</i> (S), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,343	Умеренная	0,23
<i>M. mylohyoideus</i> (S), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	-0,315	Умеренная	0,272
<i>M. mylohyoideus</i> (S), время жевания/ покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,377	Умеренная	0,183
<i>M. mylohyoideus</i> (S), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (D) (rxу)	0,46	Умеренная	0,098

Table 1

## Tone analysis m. masseter (D) depending on indicators of bioelectric activity of temporal and sublingual muscles

Parameter	Correlation characteristic		
	rxy	Cheddock Bond Tightness	p
M. temporalis (D), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,131	Weak	0,655
M. temporalis (D), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,017	No connection	0,955
M. temporalis (D), area – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,133	Weak	0,651
M. temporalis (D), chewing time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,366	Moderate	0,198
M. temporalis (D), resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,351	Moderate	0,218
M. temporalis (D), chewing/resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,392	Moderate	0,166
M. temporalis (D), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,401	Moderate	0,156
M. mylohyoideus (D), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,392	Moderate	0,166
M. mylohyoideus (D), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,442	Moderate	0,114
M. mylohyoideus (D), area – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,351	Moderate	0,218
M. mylohyoideus (D), chewing time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,245	Weak	0,399
M. mylohyoideus (D), resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,215	Weak	0,46
M. mylohyoideus (D), chewing/resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,201	Weak	0,49
M. mylohyoideus (D), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,313	Moderate	0,275
M. temporalis (S), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,355	Moderate	0,213
M. temporalis (S), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,365	Moderate	0,2
M. temporalis (S), area – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,513	Noticeable	0,06
M. temporalis (S), chewing time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,435	Moderate	0,12
M. temporalis (S), resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,393	Moderate	0,165
M. temporalis (S), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,453	Moderate	0,103
M. mylohyoideus (S), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,032	No connection	0,912
M. mylohyoideus (S), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,023	No connection	0,939
M. mylohyoideus (S), area – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,141	Weak	0,63
M. mylohyoideus (S), chewing time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,343	Moderate	0,23
M. mylohyoideus (S), resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	-0,315	Moderate	0,272
M. mylohyoideus (S), chewing/resting time – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,377	Moderate	0,183
M. mylohyoideus (S), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rxy)	0,46	Moderate	0,098

Корреляционный анализ позволил обнаружить наличие 4 слабых положительных, 2 слабых отрицательных, 14 умеренных положительных, 3 умеренных отрицательных и 1 заметной положительной корреляционных связей между тоном правой собственно жевательной мышцы и параметрами биоэлектрической активности правых и левых височных и подъязычных мышц.

Наблюдаемые зависимости были рассчитаны методом парной линейной регрессии для тесно-

ты связи по шкале Чеддока (умеренной, заметной) и описываются уравнениями:

$$Y_{\text{Тонус м. masseter (D)}} = 65,587 + 3,657 \times X_{\text{M. temporalis (D), время жевания}}$$

При увеличении m. temporalis (D), времени жевания на 1 следует ожидать увеличение тона м. masseter (D) на 3,657.

$$Y_{\text{Тонус м. masseter (D)}} = 173,39 - 3,635 \times X_{\text{M. temporalis (D), время покоя}}$$

При увеличении *m. temporalis* (D), времени покоя на 1 следует ожидать уменьшение тонуса *m. masseter* (D) на 3,635.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 97,069 + 21,951 \times X_{\text{M. temporalis (D), время жевания/покоя}}$$

При увеличении *m. temporalis* (D), времени жевания/покоя на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 21,951.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 78,324 + 32,416 \times X_{\text{M. temporalis (D), частота жеваний}}$$

При увеличении *m. temporalis* (D), частоты жеваний на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 32,416.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 98,977 + 0,029 \times X_{\text{M. mylohyoideus (D), максимальная амплитуда}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (D), максимальной амплитуды на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 0,029.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 79,444 + 0,208 \times X_{\text{M. mylohyoideus (D), средняя амплитуда}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (D), средней амплитуды на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 0,208.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 113,428 + 0,02 \times X_{\text{M. mylohyoideus (D), площадь}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (D), площади на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 0,02.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 105,156 + 17,017 \times X_{\text{M. mylohyoideus (D), частота жеваний}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (D), частоты жеваний на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 17,017.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 104,043 + 0,024 \times X_{\text{M. temporalis (S), максимальная амплитуда}}$$

При увеличении *m. temporalis* (S), максимальной амплитуды на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 0,024.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 91,342 + 0,165 \times X_{\text{M. temporalis (S), средняя амплитуда}}$$

При увеличении *m. temporalis* (S), средней амплитуды на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 0,165.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 99,327 + 0,04 \times X_{\text{M. temporalis (S), площадь}}$$

При увеличении *m. temporalis* (S), площади на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 0,04.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 94,697 + 3,005 \times X_{\text{M. temporalis (S), время жевания}}$$

При увеличении *m. temporalis* (S), времени жевания на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 3,005.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 179,536 - 2,823 \times X_{\text{M. temporalis (S), время покоя}}$$

При увеличении *m. temporalis* (S), времени покоя на 1 следует ожидать уменьшение тонуса *m. masseter* (D) на 2,823.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 87,553 + 30,014 \times X_{\text{M. temporalis (S), частота жеваний}}$$

При увеличении *m. temporalis* (S), частоты жеваний на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 30,014.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 62,984 + 3,828 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S), время жевания}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (S), времени жевания на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 3,828.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 173,22 - 3,595 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S), время покоя}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (S), времени покоя на 1 следует ожидать уменьшение тонуса *m. masseter* (D) на 3,595.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 95,298 + 23,622 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S), время жевания/покоя}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (S), времени жевания/покоя на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 23,622.

$$Y_{\text{Тонус } m. \text{ masseter (D)}} = 74,566 + 35,385 \times X_{\substack{\text{M. mylohyoideus (S),} \\ \text{частота жеваний}}}$$

При увеличении *m. mylohyoideus* (S), частоты жеваний на 1 следует ожидать увеличение тонуса *m. masseter* (D) на 35,385.

Помимо этого, нами был выполнен анализ тонуса *m. masseter* (S) в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц (Табл. 2).

Таблица 2

**Анализ тонуса *m. masseter* (S) в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц**

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	гху	Теснота связи по шкале Чеддока	р
<i>M. temporalis</i> (D), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,3	Умеренная	0,297
<i>M. temporalis</i> (D), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,381	Умеренная	0,179
<i>M. temporalis</i> (D), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,283	Слабая	0,327
<i>M. temporalis</i> (D), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,125	Слабая	0,67
<i>M. temporalis</i> (D), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,089	Нет связи	0,762
<i>M. temporalis</i> (D), время жевания/покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,084	Нет связи	0,775
<i>M. temporalis</i> (D), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,37	Умеренная	0,193
<i>M. mylohyoideus</i> (D), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,143	Слабая	0,625
<i>M. mylohyoideus</i> (D), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,234	Слабая	0,42
<i>M. mylohyoideus</i> (D), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,109	Слабая	0,711
<i>M. mylohyoideus</i> (D), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,008	Нет связи	0,977
<i>M. mylohyoideus</i> (D), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,003	Нет связи	0,992
<i>M. mylohyoideus</i> (D), время жевания/покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,004	Нет связи	0,989
<i>M. mylohyoideus</i> (D), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,016	Нет связи	0,956
<i>M. temporalis</i> (S), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,165	Слабая	0,572
<i>M. temporalis</i> (S), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,376	Умеренная	0,185
<i>M. temporalis</i> (S), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,32	Умеренная	0,265
<i>M. temporalis</i> (S), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,103	Слабая	0,726
<i>M. temporalis</i> (S), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,101	Слабая	0,732
<i>M. temporalis</i> (S), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,277	Слабая	0,337
<i>M. mylohyoideus</i> (S), максимальная амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,464	Умеренная	0,095
<i>M. mylohyoideus</i> (S), средняя амплитуда – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,466	Умеренная	0,093
<i>M. mylohyoideus</i> (S), площадь – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,413	Умеренная	0,142
<i>M. mylohyoideus</i> (S), время жевания – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,217	Слабая	0,457
<i>M. mylohyoideus</i> (S), время покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,181	Слабая	0,535
<i>M. mylohyoideus</i> (S), время жевания/покоя – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	0,168	Слабая	0,567
<i>M. mylohyoideus</i> (S), частота жеваний – Тонус <i>m. masseter</i> (S) (гху)	-0,318	Умеренная	0,268

Table 2

## Tone analysis m. masseter (S) depending on indicators of bioelectric activity of temporal and sublingual muscles

Parameter	Correlation characteristic		
	rx	Cheddock Bond Tightness	p
M. temporalis (D), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,3	Moderate	0,297
M. temporalis (D), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,381	Moderate	0,179
M. temporalis (D), area – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,283	Weak	0,327
M. temporalis (D), chewing time – Tone m. masseter (D) (rx)	0,125	Weak	0,67
M. temporalis (D), resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,089	No connection	0,762
M. temporalis (D), chewing/resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	0,084	No connection	0,775
M. temporalis (D), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,37	Moderate	0,193
M. mylohyoideus (D), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	0,143	Weak	0,625
M. mylohyoideus (D), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,234	Weak	0,42
M. mylohyoideus (D), area – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,109	Weak	0,711
M. mylohyoideus (D), chewing time – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,008	No connection	0,977
M. mylohyoideus (D), resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	0,003	No connection	0,992
M. mylohyoideus (D), chewing/resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,004	No connection	0,989
M. mylohyoideus (D), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,016	No connection	0,956
M. temporalis (S), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,165	Weak	0,572
M. temporalis (S), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,376	Moderate	0,185
M. temporalis (S), area – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,32	Moderate	0,265
M. temporalis (S), chewing time – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,103	Weak	0,726
M. temporalis (S), resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	0,101	Weak	0,732
M. temporalis (S), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,277	Weak	0,337
M. mylohyoideus (S), maximum amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,464	Moderate	0,095
M. mylohyoideus (S), average amplitude – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,466	Moderate	0,093
M. mylohyoideus (S), area – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,413	Moderate	0,142
M. mylohyoideus (S), chewing time – Tone m. masseter (D) (rx)	0,217	Weak	0,457
M. mylohyoideus (S), resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,181	Weak	0,535
M. mylohyoideus (S), chewing/resting time – Tone m. masseter (D) (rx)	0,168	Weak	0,567
M. mylohyoideus (S), chewing frequency – Tone m. masseter (D) (rx)	-0,318	Moderate	0,268

Корреляционный анализ позволил обнаружить наличие 5 слабых положительных, 7 слабых отрицательных, 9 умеренных отрицательных корреляционных связей между тонусом левой собственно жевательной мышцы и параметрами биоэлектрической активности правых и левых височных и подъязычных мышц.

Таким образом, мы видим увеличение числа слабых положительных и отрицательных, значительное уменьшение умеренных и отсутствие заметных корреляционных связей между тонусом левой собственно жевательной мышцы и параметрами биоэлектрической активности правых и левых ви-

сочных и подъязычных мышц по сравнению с тонусом правой собственно жевательной мышцы. Это свидетельствует о большем влиянии тонуса правой собственно жевательной мышцы на показатели биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц, что может быть связано с правосторонним типом жевания или другими физиологическими характеристиками, что необходимо учитывать при планировании ортодонтического лечения, разработке комплекса профилактических упражнений и поддержания результатов в ретенционном периоде.

Наблюдаемые зависимости были рассчитаны методом парной линейной регрессии для тесноты

связи по шкале Чеддока выше умеренной и описываются уравнениями:

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 164,371 - 0,011 \times X_{\text{M. temporalis (D),}} \\ \text{максимальная амплитуда}$$

При увеличении m. temporalis (D), максимальной амплитуды на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,011

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 174,458 - 0,109 \times X_{\text{M. temporalis (D),}} \\ \text{средняя амплитуда}$$

При увеличении m. temporalis (D), средней амплитуды на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,109

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 188,071 - 28,122 \times X_{\text{M. temporalis (D),}} \\ \text{частота жеваний}$$

При увеличении m. temporalis (D), частоты жеваний на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 28,122

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 180,461 - 0,16 \times X_{\text{M. temporalis (S),}} \\ \text{средняя амплитуда}$$

При увеличении m. temporalis (S), средней амплитуды на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,16

Наблюдаемая зависимость описывается уравнением:

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 161,869 - 0,024 \times X_{\text{M. temporalis (S),}} \text{ площадь}$$

При увеличении m. temporalis (S), площади на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,024

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 167,364 - 0,012 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S),}} \\ \text{максимальная амплитуда}$$

При увеличении m. mylohyoideus (S), максимальной амплитуды на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,012

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 176,436 - 0,107 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S),}} \\ \text{средняя амплитуда}$$

При увеличении m. mylohyoideus (S), средней амплитуды на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,107

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 169,352 - 0,018 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S),}} \text{ площадь}$$

При увеличении m. mylohyoideus (S), площади на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 0,018

$$Y_{\text{Тонус m. masseter (S)}} = 179,709 - 22,949 \times X_{\text{M. mylohyoideus (S),}} \\ \text{частота жеваний}$$

При увеличении m. mylohyoideus (S), частоты жеваний на 1 следует ожидать уменьшение тонуса m. masseter (S) на 22,949.

Проведенное исследование позволило выявить некоторые особенности функциональной сопряженности тонуса и биоэлектрической активности мышц, вовлеченных в процесс жевания у детей с аномалиями зубочелюстной системы.

Обнаружено увеличение числа слабых положительных и отрицательных, значительное уменьшение умеренных и отсутствие заметных корреляционных связей между тонусом левой собственно жевательной мышцы и параметрами биоэлектрической активности правых и левых височных и подъязычных мышц по сравнению с тонусом правой собственно жевательной мышцы. Это свидетельствует о большем влиянии тонуса правой собственно жевательной мышцы на показатели биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц, что может быть связано с правосторонним типом жевания или другими физиологическими характеристиками.

Полученные нами данные согласуются с работой, доказывающей, что сравнительная электромиография позволяет установить сторону и тип жевания у конкретного пациента. Кроме того, авторы полагают, что электромиография позволяет изучать скоординированность работы мышц-антагонистов и синергистов до начала, в процессе, а также в ретенционном периоде ортодонтического лечения [11].

И.В. Токаревич и соавт. результате проведенного исследования обнаружили тесную взаимосвязь между морфологическими, функциональными изменениями зубочелюстной системы у детей в возрасте 7—8 лет и электромиографическими показателями мышечных дисфункций жевательного аппарата, что так же согласуется с нашими результатами [12].

Проведенное нами исследование позволило рассчитать наблюдаемые зависимости методом парной линейной регрессии в виде 27 уравнений, которые могут быть использованы в качестве прогностических моделей расчета тонуса правых и левых собственно жевательных мышц в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц, что имеет важное клиническое значение и может быть использовано для прогнозирования результатов ортодонтического лечения и расчета его сроков.

## Выводы

В результате исследования обнаружено большее влияние тонуса правой собственно жевательной мышцы на показатели биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц по сравнению с тонусом левой собственно жевательной мышцы.

Обнаруженные зависимости позволили вывести 27 уравнений, которые могут быть использованы в качестве прогностических моделей расчета тонуса правых и левых собственно жевательных мышц в зависимости от показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц.

Обнаруженные взаимосвязи и зависимости могут быть использованы для прогнозирования изменения функциональных параметров в результате стоматологического лечения, разработки комплекса профилактических упражнений и поддержания результатов в ретенционном периоде.

## Библиографический список

1. Ippolitov Y.A., Bondareva E.N., Tatarintsev M.M., Alireza M.A., Lesnikov R.V. Personified orthodontic treatment of adults with malocclusions and deformations in dentition depending on the degree of caries resistance of the dental enamel // *Int. J. Pediatr.* 2020. Т. 8. № 10. С. 12143–12150.
2. Santos A.C., Silva C.A.B. Surface electromyography of masseter and temporal muscles with use percentage while chewing

on candidates for gastroplasty // *Brazilian Arch. Dig. Surg.* 2016. Т. 29. № 1. С. 48–52.

3. Gadotti I., Hicks K., Koscs E., Lynn B., Estrazulas J., Civitella F. Electromyography of the masticatory muscles during chewing in different head and neck postures - A pilot study // *J. oral Biol. craniofacial Res.* 2020. Т. 10. № 2. С. 23–27.

4. Prado D.G. de A., Berretin-Felix G., Migliorucci R.R., et al. Effects of orofacial myofunctional therapy on masticatory function in individuals submitted to orthognathic surgery: a randomized trial // *J. Appl. Oral Sci.* 2018. Т. 26. С. 164.

5. Luo Z., Lo W.L.A., Bian .R, Wong S., Li L. Advanced quantitative estimation methods for spasticity: a literature review // *J. Int. Med. Res.* 2019. Т. 48. № 3. doi: 10.1177/0300060519888425.

6. Payenok A.V. Morozova O.G., Payenok O.S., Mitelman I.M., Bilianskiy O.Y. Features of estimation of muscle tone and functional state of spinal motor neurons in patients with post-stroke spasticity on a background of a pharmacological correction // *Wiad. Lek.* 2019. Т. 72. № 10. С. 1939–1941.

7. Косолапова И.В., Дорохов Е.В., Коваленко М.Э. Особенности корреляции показателей электромиографического и миотонометрического исследований у детей с аномалиями зубочелюстной системы // *Вестник волгоградского государственного медицинского университета*. 2020. Т. 73. № 1. С. 160–163.

8. Uehara F. Hori K., Murakami K., Okawa J., Ono T. Differentiation of Feeding Behaviors Based on Masseter and Supra-Hyoid Muscle Activity // *Front. Physiol.* 2020. Т. 11. С. 618.

9. Худорошков Ю.Г., Карагозян Я.С. Оценка функционального состояния жевательных мышц у пациентов с постоянным прикусом в норме и с нарушениями окклюзии // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 4. С. 146–151.

10. Абрамян А.А. Dyakonova E.D., Persin L.S., Porohin A.Yu. Оценка изменения тонуса жевательных мышц в зависимости от положения тела пациента // *Стоматология как наука*. 2013. Т. 3. № 9. С. 1076.

11. Худорошков Ю.Г., Карагозян Я.С. Оценка функционального состояния жевательных мышц у пациентов с постоянным прикусом в норме и с нарушениями окклюзии // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 4. С. 146–151.

12. Токаревич И.В. Анализ состояния жевательных и височных мышц у детей с миофункциональными нарушениями в возрасте 7–8 лет и оценка эффективности их ортодонтической коррекции // *Вестник БГМУ*. 2013. №4. С.10–22.

## References

1. Ippolitov YA, Bondareva EN, Tatarintsev MM, Alireza MA, Lesnikov RV. Personified orthodontic treatment of adults with malocclusions and deformations in dentition depending on the degree of caries resistance of the dental enamel // *International journal of pediatrics*. 2020;8(10):12143–50. doi: 10.22038/ijp.2020.49505.3961
2. Santos AC Dos, Silva CAB da. Surface electromyography of masseter and temporal muscles with use percentage while chewing on candidates for gastroplasty. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva*. 2016;29(1):48–52. doi: 10.1590/0102-6720201600S10013
3. Gadotti I, Hicks K, Koscs E, Lynn B, Estrazulas J, Civitella F. Electromyography of the masticatory muscles during chewing in different head and neck postures - A pilot study. *Journal of oral biology and craniofacial research*. 2020;10(2):23–7. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.02.002

4. Prado DG de A, Berretin-Felix G, Migliorucci RR et al. Effects of orofacial myofunctional therapy on masticatory function in individuals submitted to orthognathic surgery: a randomized trial. *Journal of Applied Oral Science*. 2018;26:164. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0164
5. Luo Z, Lo WLA, Bian R, Wong S, Li L. Advanced quantitative estimation methods for spasticity: a literature review. *Journal of International Medical Research*. 2019;48(3). doi: 10.1177/0300060519888425
6. Payenok A V, Morozova OG, Payenok OS, Mitelman IM, Bilianskyi OY. Features of estimation of muscle tone and functional state of spinal motor neurons in patients with post-stroke spasticity on a background of a pharmacological correction. *Wiadomosci lekarskie*. 2019;72(10):1939–41.
7. Kosołapova IV, Dorokhov EV, Kovalenko ME. Features of correlation of electromyographic and myotonometric studies in children with anomalies dentoalveolar system. *J Volgogr State Med Univ*. 2020;73(1):160–3. (In Russ).
8. Uehara F, Hori K, Murakami K, Okawa J, Ono T. Differentiation of Feeding Behaviors Based on Masseter and Supra-Hyoid Muscle Activity. *Frontiers in physiology*. 2020;11:618. doi: 10.3389/fphys.2020.00618
9. Khudoroshkov UG, Karagozyan YS. Valuation of functional condition of masticatory muscles of patients with malocclusion combined with tmj dysfunction. *Modern Probl Sci Educ*. 2016;4:146–51. (In Russ).
10. Abramyan AA, Dyakonova ED, Persin LS, Porohin AYu. Evaluation of change in the tone of the chewing muscles depending on the position of the patient's body. *Dentistry as a Science*. 2013;3(9):1076. (In Russ).
11. Khudoroshkov UG, Karagozyan YS. Valuation of functional condition of masticatory muscles of patients with malocclusion combined with tmj dysfunction. *Modern Problems of Science and Education*. 2016;4:146–51. (In Russ).
12. Tokarevich IV. The analysis of the state of masseter and temporalis muscles with myofunctional disorders in children 7–8 years old and the evaluation of the effectiveness of orthodontic correction methods. *Vestnik BGMU*. 2013;4:10–22. (In Russ).

*Ответственный за переписку:* Косолапова Ирина Владимировна — ассистент кафедры нормальной физиологии Воронежского государственного медицинского университет им. Н.Н. Бурденко. Российская Федерация, 394043, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 6., E-mail: irenecherry@yandex.ru

Косолапова И.В. SPIN-код: 7244–4620, ORCID: 0000–0002–9779–7882

Дорохов Е.В. SPIN: 7464–1264, ORCID: 0000–0002–2096–411X

Коваленко М.Э. SPIN: 1108–6785, ORCID: 0000–0001–8841–5574

Лесников Р.В. SPIN-код: 3543–8111, ORCID: 0000–0002–8296–107X

*Corresponding author:* Kosołapova Irina Vladimirovna — assistant Department of normal Physiology, Institute of Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation, 394036, ul. Studencheskaya, 6, Voronezh, Russia. E-mail: irenecherry@yandex.ru

Kosołapova I.V. ORCID: 0000–0002–9779–7882

Dorokhov E.V. ORCID: 0000–0002–2096–411X

Kovalenko M.E. ORCID: 0000–0001–8841–5574

Lesnikov R.V. ORCID: 0000–0002–8296–107X

DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-147-153

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ  
RESEARCH ARTICLE

## Оценка цитогенетического действия кофеина в микроядерном тесте

Н.А. Дурнова\*, А.Р. Кланцатая, М.Н. Курчатова, А.Ю. Каретникова, А.С. Шереметьева

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, г. Саратов, Российская Федерация  
\*ndurnova@mail.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Употребление кофеинсодержащих продуктов питания в современном мире обязательно должно быть безопасным для человека, в том числе не должно влиять на наследственный материал организма. *Цель исследования:* определить возможное действие кофеина на цитогенетическом уровне микроядерным методом на эритроцитах. *Материалы и методы.* Объектами для исследования выбраны нелинейные мыши, которые были поделены на 6 групп — одна группа контрольная и 5 групп опытных. Первая опытная группа и вторая в эксперименте получали кофеин в дозах 40 мг/кг и 100 мг/кг. Третьей группе вводили диоксидин (доза равнялась 200 мг/кг). Четвертая и пятая группа подвергалась воздействию кофеина в дозах 40 мг/кг и 100 мг/кг совместно с диоксидином. Контрольная группа получала физиологический раствор. Кофеин вводили перорально. Мутаген (диоксидин) вводился внутривентриально. На 5-е сутки экспериментального исследования мы проводили забор крови на цитогенетический анализ. *Результаты и обсуждение.* Наше исследование препарата кофеина позволило определить следующие закономерности. Во-первых, при введении в течение 5 дней кофеин в дозе 40 и 100 мг/кг не вызывал увеличения количества микроядер в эритроцитах крови у мышей. Во-вторых, сочетанное применение кофеина (как в дозе 40 мг/кг, так и в дозе 100 мг/кг) и диоксида достоверно повышало уровень микроядер по сравнению с группой контроля. В-третьих, кофеин в дозе 40 мг/кг не увеличил мутагенную активность диоксида, но доза кофеина в 100 мг/кг при сочетанном применении с мутагеном привела к достоверному повышению уровня цитогенетических повреждений. *Выводы.* По нашим данным, кофеин в экспериментальном исследовании не являлся мутагеном, но в дозе 100 мг/кг оказывал комутагенное действие.

**Ключевые слова:** кофеин, диоксидин, микроядра

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования — все авторы; проведение эксперимента и получение данных — М.Н. Курчатова, А.Ю. Каретникова, А.Р. Кланцатая; обработка данных и написание статьи — Н.А. Дурнова, М.Н. Курчатова, А.Ю. Каретникова; анализ и интерпретация результатов — Н.А. Дурнова, М.Н. Курчатова, А.С. Шереметьева; утверждение рукописи для публикации — Н.А. Дурнова.

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

Поступила 20.11.2020. Принята 11.02.2021.

**Для цитирования:** Дурнова Н.А., Кланцатая А.Р., Курчатова М.Н., Каретникова А.Ю., Шереметьева А.С. Оценка цитогенетического действия кофеина в микроядерном тесте // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 147—153. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-147-153

© Дурнова Н.А., Кланцатая А.Р., Курчатова М.Н., Каретникова А.Ю., Шереметьева А.С., 2021



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

## Cytogenetic effect of caffeine in the micronucleus test

N.A. Durnova\*, A.R. Klantsataya, M.N. Kurchatova, A. Yu. Karetnikova, A.S. Sheremetyeva

Saratov State Medical University, Saratov, Russian Federation

\*Corresponding author: ndurnova@mail.ru

**Annotation. Relevance.** The consumption of caffeine-containing food in the modern world must necessarily be safe for humans, including should not affect the hereditary material of the body. **Objective:** to determine the possible effect of caffeine at the cytogenetic level by the micronucleus method on erythrocytes. **Materials and Methods.** The objects for the study were non-linear mice, which were divided into 6 groups — one control group and 5 experimental groups. The first experimental group and the second in the experiment received caffeine in doses of 40 mg/kg and 100 mg/kg. The control group received saline. Caffeine was administered orally. The mutagen (dioxidine) was injected intraperitoneally. On the 5th day of the experimental study, we performed blood sampling for cytogenetic analysis. **Results and Discussion.** Our study of the caffeine preparation made it possible to determine the following patterns. Firstly, when administered within 5 days, caffeine at a dose of 40 and 100 mg/kg did not cause an increase in the number of micronuclei in erythrocytes in mice. Secondly, the combined use of caffeine (both at a dose of 40mg/kg and at a dose of 100 mg / kg) and dioxidine significantly increased the level of micronuclei in comparison with the control group. Thirdly, caffeine at a dose of 40mg/kg did not increase the mutagenic activity of dioxidine, but a dose of caffeine of 100mg/kg when combined with a mutagen led to a significant increase in the level of cytogenetic damage. **Conclusion.** According to our data, caffeine in the experimental study was not a mutagen, but at a dose of 100 mg/kg it represented a comutagenic effect.

**Key words:** caffeine, dioxidine, micronuclei

**Author contributions:** concept and design of the study — all authors; experiment and data acquisition — M.N. Kurchatova, A. Yu. Karetnikova, A.R. Klantsataya; data processing and article writing — N.A. Durnova, M.N. Kurchatova, A. Yu. Karetnikova; analysis and interpretation of results — N.A. Durnova, M.N. Kurchatova, A.S. Sheremetyeva; approval of the manuscript for publication — N.A. Durnova.

**Conflict of interest statement.** Authors declare the absence of the possible conflicts of interests.

Received 20.11.2020. Accepted 11.02.2021.

**For citation:** Durnova NA, Klantsataya AR, Kurchatova MN, Karetnikova AYU, Sheremetyeva AS. Cytogenetic effect of caffeine in the micronucleus test. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):147—153. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-147-153

### Введение

Кофеин, без сомнения, часто встречающееся в рационе людей всего мира вещество [1, 2]. Помимо пищевой ценности кофеин также имеет значение как лекарственный препарат [3—7], в связи с чем важно ответить на вопрос о наличии либо отсутствии отрицательного влияния кофеина как продукта питания, так и лекарственного препарата [8—14].

Кофеин неоднократно становился предметом различных исследований. Получены данные о его влиянии на молекулярном, клеточном [15], организменном уровнях [16—18]. В том числе имеются

данные о влиянии кофеина на наследственный аппарат клеток, а именно: процессы репарации и метилирования ДНК, мутагенеза, комутагенеза [19, 20]. Следует отметить, что до настоящего времени по результатам исследований сохраняется противоречие. Так, кофеин проявлял ДНК-протекторные свойства в эксперименте с использованием в качестве мутагена электромагнитного излучения [19], в то же время есть данные о том, что кофеин ингибирует ферменты, ответственные за репарацию ДНК [21].

**Цель исследования:** провести анализ возможного мутагенного действия кофеина на млекопитающих.

## Материалы и методы

Эксперименты проведены на 36 беспородных белых мышах-самцах (возраст: 8—12 недель, вес: 35—40 г.). Мыши содержались в стандартных условиях вивария (12-часовой световой режим, со свободным доступом к воде и пище). Правила содержания и ухода полностью соответствовали нормативам, представленным в руководстве National Research Council-2011, и правилам, утвержденным ГОСТ Р 53434—2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Все эксперименты выполнены в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990), а также Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция 2000 г.) и с одобрением этического комитета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (протокол № 3 от 06.11.2018 года).

Эксперимент длился 15 дней. Мыши-самцы были распределены на 6 групп (по 6 животных в каждой):

- физиологический раствор (контрольная группа) по весу;
- диоксидин (мутаген) в дозе 200 мг/кг;
- кофеин в дозе 40 мг/кг;
- кофеин в дозе 100 мг/кг;
- кофеин (40 мг/кг) + диоксидин в дозе 200 мг/кг;
- кофеин (100 мг/кг) + диоксидин в дозе 200 мг/кг.

Каждая группа получала свой препарат/препараты ежедневно. Кофеин мыши получали перорально, а мутаген — внутривентриально. Дозы обоснованы ранее проведенными исследованиями [20]. Диоксидин («ОАО «Валента Фармацевтика», Россия) является стандартным мутагеном для индукции повреждений наследственного материала в эксперименте [20, 22]. Мазки крови изготавливались на 5-е сутки после введения препаратов (окраска по Романовскому), с каждого стекла просматривалось по 2000—3000 эритроцитов. Доля микроядер вычисляли в промилле (‰).

Микроядра представляют собой хроматиновые округлые образования на периферии клетки (эритроцита), образующиеся при воздействии мутагена. Достоверное повышение числа эритроцитов с микроядрами в опытных группах по сравнению с контрольной (в нашем случае при введении хлорида натрия) свидетельствует о мутагенности используемого вещества [22].

Статистическая обработка данных проведена с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни ( $p \leq 0.01$ ).

## Результаты и обсуждение

Результаты нашего эксперимента показали дозозависимое воздействие кофеина на наследственный материал мышей.

По результатам исследования пероральное пятикратное введение кофеина мышам-самцам в дозах 40 мг/кг ( $0,28 \pm 0,486$  ‰) и 100 мг/кг ( $0,36 \pm 0,556$  ‰) не приводило к достоверному увеличению количества эритроцитов с микроядрами по сравнению контрольной группой (0 ‰) (табл. 1). Группы, получавшие кофеин в дозе 40 и 100 мг/кг, не различались между собой по количеству микроядер в крови мышей (табл. 2). Представленные данные доказывают отсутствие мутагенности у кофеина при его пероральном введении.

У животных, которые получали внутривентриально диоксидин, уровень микроядер составлял  $11,96 \pm 3,853$  ‰, таким образом, подтверждаются мутагенные свойства диоксида.

Введение кофеина мышам в дозе 40 мг/кг ( $7,84 \pm 2,646$  ‰) и в дозе 100 мг/кг ( $19,18 \pm 1,656$  ‰) совместно с диоксидином приводило к достоверному повышению уровня микроядер в крови (табл. 1) по сравнению с группой контроля (получавшей физиологический раствор). Введение кофеина в дозе 40 мг/кг не увеличивало мутагенную активность диоксида, а введение кофеина в дозе 100 мг/кг сочетано с мутагеном привело к достоверному увеличению уровня повреждений наследственного аппарата (табл. 1, 2).

Таблица 1

Уровень микроядер в эритроцитах животных экспериментальных групп

Контроль	Кофеин 40мг/кг	Кофеин 100 мг/кг	Диоксидин 200 мг/кг	Кофеин 40 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг	Кофеин 100 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг
0 p2≤0.01	0,28±0,486 % p1>0.05 p2≤0.01	0,36±0,556 % p1>0.05 p2≤0.01	11,96±3,853 % p1≤0.01	7,84±2,646 % p1≤0.01 p2>0.05	19,18±1,656 % p1≤0.01 p2≤0.01

Примечание: p1 – по сравнению с контролем, p2 – по сравнению с группой, получавшей диоксидин 200 мг/кг.

Table 1

The level of micronuclei in erythrocytes of animals of the experimental groups

Control	Caffeine 40 mg/kg	Caffeine 100 mg/kg	Dioxidine 200 mg/kg	Caffeine 40 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg	Caffeine 100 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg
0 p2≤0.01	0,28±0,486 % p1>0.05 p2≤0.01	0,36±0,556 % p1>0.05 p2≤0.01	11,96±3,853 % p1≤0.01	7,84±2,646 % p1≤0.01 p2>0.05	19,18±1,656 % p1≤0.01 p2≤0.01

Note: p1 – compared with control, p2 – compared with the group receiving dioxidine 200 mg/kg.

Таблица 2

Попарное сравнение групп

Группа	Контроль	Кофеин 40мг/кг	Кофеин 100 мг/кг	Диоксидин 200 мг/кг	Кофеин 40 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг	Кофеин 100 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг
Контроль	-	p>0.05	p>0.05	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01
Кофеин 40мг/кг	p>0.05	-	p>0.05	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01
Кофеин 100 мг/кг	p>0.05	p>0.05	-	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01
Диоксидин 200 мг/кг	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	-	p>0.05	p≤0.01
Кофеин 40 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	p>0.05	-	p≤0.01
Кофеин 100 мг/кг + Диоксидин 200 мг/кг	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	-

Примечание: достоверность при p≤0.01

Table 2

## Pairwise comparison of groups

Group	Control	Caffeine 40 mg/kg	Caffeine 100 mg/kg	Dioxidine 200 mg/kg	Caffeine 40 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg	Caffeine 100 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg
Control	-	p>0.05	p>0.05	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01
Caffeine 40 mg/kg	p>0.05	-	p>0.05	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01
Caffeine 100 mg/kg	p>0.05	p>0.05	-	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01
Dioxidine 200 mg/kg	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	-	p>0.05	p≤0.01
Caffeine 40 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	p>0.05	-	p≤0.01
Caffeine 100 mg/kg + Dioxidine 200 mg/kg	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	p≤0.01	-

Note: reliability at p≤0.01

Наши результаты показали, что кофеин не является мутагеном при его пероральном введении, но он показал комутагенный эффект при его использовании в дозе 100 мг/кг. По более ранним данным, кофеин в дозе 100 мг/кг (при введении совместно с диоксидином) не проявил комутагенных свойств при изучении индукции мутаций на метафазных хромосомах костного мозга мышей [20]. Но при применении иного мутагена, циклофосамида, кофеин в аналогичных нашему эксперименту дозах (10 мг/кг и 100 мг/кг) проявил комутагенный эффект [20]. Вероятно, противоречие в результатах объясняется разными цитогенетическими методиками, которые использовались при исследовании кофеина.

Изучение эффектов кофеина проводится уже многие десятилетия, и накоплены данные о его многостороннем воздействии на разные организмы. Так, установлена его мутагенная активность в отношении кишечной палочки, при воздействии на растительные клетки, но результаты исследований его влияния на млекопитающих противоречивы [23]. Например, получена информация о повреждении наследственного материала у разных организмов под воздействием разных концентраций кофеина [24], однако установлено его генопротекторное действие в эксперименте с *Salmonella typhimurium* [25]. Так как кофеин продолжает оста-

ваться одним из популярных пищевых продуктов среди населения всего мира [26], широко встречается как загрязнитель в природе [27] и может влиять на развитие некоторых заболеваний [28], исследования его действия на организм человека должны оставаться одним из приоритетных направлений.

## Выводы

1. Кофеин в нашем экспериментальном исследовании не проявил мутагенность во всех исследованных дозах.
2. Кофеин в дозе 100 мг/кг в сочетании с диоксидином продемонстрировал комутагенное действие.

## Библиографический список

1. *Chu Y.F.* Coffee: emerging health effects and disease prevention. Wiley-Blackwell. 2012. P. 352.
2. *Porta M., Vioque J., Ayude D., Alguacil J., Jarrod M., Ruiz L., et al.* Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures // *European Journal of Epidemiology*. 2003. Vol. 18. №4. P. 289–298.
3. *Козачук И.В.* К вопросу о физиологических эффектах кофеина на организм человека // *Вестник российских университетов. Математика*. 2009. Т. 14. № 1. С. 45–47.
4. *Сиволап Ю.П., Дамулин И.В.* Кофеин и болезнь Альцгеймера // *Неврологический вестник*. 2017. Т. 49. № 4. С. 5–10.

5. Bohn S.K., Ward N.C., Hodgson J.M., Croft K.D. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk // *Food & Function*. 2012. Vol. 3. № 6. P. 575-591.
6. Проскурякова Т.В., Гришин М.Э. Кофеин и психическое здоровье // *Психическое здоровье*. 2016. Т. 14. № 10. С. 76–82.
7. Азимова Ю.Э., Рачин А.П. Мигрень, кофеин, эрготамин: классическое трио // *Поликлиника*. 2016. № 1. С. 28–30.
8. Cano-Marquina A., Tarin J.J., Cano A. The impact of coffee on health // *Maturitas*. 2013. Vol. 75. № 1. P. 7–21.
9. Зайнуллин Р.А., Кунакова Р.В., Егорова Е.Ю. Кофе, кофеин и генетика человека // *Пиво и напитки*. 2015. № 6. С. 50–54.
10. Brambilla G., Martelli A. Update on genotoxicity and carcinogenicity test in 472 marketed pharmaceuticals // *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. 2009. Vol. 681. № 2–3. P. 209–229.
11. Голубева И.С., Бармашов А.Е., Рудакова А.А., Барышникова М.А., Рук Н.С., Скрябина А.Ю. и др. Цитотоксическая активность комплексов иодидов цинка и кадмия с антипирином, кофеином и фенантролином // *Российский биотерапевтический журнал*. 2017. Т. 16. № 3. С. 75–78. doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-75-78
12. Селиверстов Ю.А., Бабин М.Е. Кофеин и его влияние на нейродегенеративные заболевания // *Медицинский алфавит*. 2018. Т. 2. № 17. С. 37–42.
13. Курпякова А.Ф., Быков В.Н., Чепур С.В., Юдин М.А., Никифоров А.С. Изучение эффективности комбинации дитионита, кеторолака и кофеина на модели тяжелого отравления крыс этанолом // *Токсикологический вестник*. 2011. № 5. Т. 110. С. 14–17.
14. Курылева О.М., Грачева О.Н., Вятлева О.А., Кузнецова Е.Г., Саломатина Л.А., Севастьянов В.И. Исследования специфической эффективности трансдермальной терапевтической системы кофеина на здоровых добровольцах // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2008. № 1. С. 40–44.
15. Северина Т.Г. Влияние кофеин-бензоата натрия на активность лизосомных ферментов печени и устойчивость крыс к острой иммерсионной гипотермии // *Военная медицина*. 2009. № 2. Т. 51. С. 110–114.
16. Левикин К.Е., Качанов Д.А., Лапкина Г.Я., Слобожанин А.А., Павлыш А.В. Сравнительные эффекты влияния антидепрессантов разных фармакологических групп на поведение взрослых особей *Danio rerio* // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2020. Т. 18. № 1. С. 51–56. doi: 10.17816/RCF18151-56
17. 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.
18. Подольский И.Н., Штрыголь С.Ю., Зубков В.А., Гриценко И.С. Взаимодействие перспективного антидепрессанта с ноотропными свойствами 2-метил-3-фениламинотетрагидропиридина с веществами, возбуждающими и угнетающими ЦНС // *Медицинский вестник Юга России*. 2014. № 1. С. 80–84. doi: 10.21886/2219-8075-2014-1-80-84
19. Скамрова Г.Б., Прилуцкий Ю.И., Евстигнеев М.П. Комбинированное действие электромагнитного излучения, ДНК-интеркаляторов, С 60-фуллерена и кофеина на клетки буккального эпителия человека // *Biotechnologia Acta*. 2014. Т. 7. № 2. С. 54–62.
20. 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.
21. Ferguson L.R., Philpott M. Nutrition and mutagenesis // *Annu. Rev. Nutr.* 2008. Vol. 28. P. 313–329.
22. Миронов А.Н., Буянтян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 862 с.
23. Timson J. Caffeine // *Mutation Research. Reviews in Genetic Toxicology*. 1977. Vol. 47. P. 1–52.
24. Hatzi V.I., Karakosta M., Barszczewska K., Karachristou I., Pantelias G, Terzoudi G.I. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed in vitro by means of the CBMN-assay and Ifish // *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2015. Vol. 793. P. 71–78.
25. Wozniowicz A., Gołuński G., Wyrzykowski D., Kaźmierkiewicz R., Piosik J. Caffeine and Other Methylxanthines as Interceptors of Food-Borne Aromatic Mutagens: Inhibition of Trp-P-1 and Trp-P-2 Mutagenic Activity. *Chemical Research in Toxicology*. 2013. Vol. 26. T. 11. P. 1660-1673. doi: 10.1021/tx4002513
26. Дурнова Н.А., Каретникова А.Ю., Исаев Д.С., Кланцатая А.Р., Шереметьева А.С. Комплексное воздействие кофеина и диоксида 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
27. Bunting S.Y., Lapworth D.J., Crane E., Grima-Olmedo J., Koroša A., Kuczyńska A., Mali N., Rosenqvist L., van Vliet M.E., Togola A., Lopez B. Emerging organic compounds in European groundwater // *Environ Pollut*. 2020; 3:115945.
28. Um C.Y., McCullough M.L., Guinter M.A., Campbell P.T., Jacobs E.J., Gapstur S.M. Coffee consumption and risk of colorectal cancer in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort // *Cancer Epidemiol*. 2020. Vol. 67. P. 101730.

## References

1. Chu YF. *Coffee: emerging health effects and disease prevention*. Wiley-Blackwell. 2012. P. 352.
2. Porta M, Vioque J, Ayude D, Alguacil J, Jarrod M, Ruiz L, et al. Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures. *European journal of epidemiology*. 2003;18(4):289–298.
3. Kozachuk IV. On the problem of physiological effects of caffeine on human organism. *Russian Universities Reports. Mathematics*. 2009; 14(1):45-47. (In Russ).
4. Sivolap YuP, Damulin IV. Caffeine and Alzheimer’s disease. *Neurology Bulletin*. 2017; 49(4):5-10. (In Russ).
5. Bohn SK, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food & Function*. 2012;3(6):575-591.
6. Proskuryakova TV, Grishin ME. Caffeine and mental health. *Psihicheskoe zdorov’e*. 2016;14(10):76-82. (In Russ).
7. Azimova YE, Rachin AP. Migraine, caffeine, ergotamine: the classic trio. *Poliklinika*. 2016;(1):28-30. (In Russ).
8. Cano-Marquina A, Tarin JJ, Cano A. The impact of coffee

on health. *Maturitas*. 2013;75(1):7–21.

9. Zainullin RA, Kunakova RV, Egorova EYu. Coffee, caffeine and human genetics. *Beer and beverages*. 2015;(6):50-54. (In Russ).

10. Brambilla G, Martelli A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. 2009;681(2–3):209–229.

11. Golubeva IS, Barmashov AE, Rudakova AA, Baryshnikova MA, Rukk NS, Skryabina AYU, et al. Cytotoxicity of zinc (II) and cadmium (II) iodide complexes with antipyrine, caffeine and phenantrolone. *Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(3):75–78. (In Russ). doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-75-78

12. Selivyorstov YuA, Babin ME. Caffeine and neurodegenerative disorders. *Medical alphabet*. 2018; 2 (17(354)):37-42. (In Russ).

13. Kurpyakova AF, Bykov VN, Chepur SV, Yudin MA, Nikiforov AS. Examination of the effectiveness of a combination of dithionite, ketorolac and caffeine on the model of a rat heavy poisoning by ethanol. *Toxicological Review*. 2011;5(110):14-17. (In Russ).

14. Kuryleva OM, Gracheva ON, Vyatleva OA, Kuznetsova EG, Salomatina LA, Sevastianov VL. Investigation of specific efficacy of caffeine transdermal therapeutic system on healthy volunteers. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2008;1:40-44. (In Russ).

15. Severina TG. Effect of caffeine sodium benzoate on the activity of liver lysosomal enzymes and the resistance of rats to acute immersion hypothermia. *Voennej amedicina*. 2009;2(51):110-114. (In Russ).

16. Levikin KE, Kachanov DA, Lapkina GYA, Slobozhanin AA, Pavlysh AV. Comparative effects of antidepressants of various pharmacological groups on the behavior of adult *Danio rerio*. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2020;18(1):51-56. (In Russ). doi: 10.17816/RCF18151-56

17. 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).

18. Podolsky IN, Shtrygol SYU, Zubkov VA, Gritsenko IS. Interaction of perspective antidepressant with nootropic properties 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one with CNS stimulants and depressants. *Medical Herald of the South of Russia*. 2014;(1):80-84. (In Russ). doi: 10.21886/2219-8075-2014-1-80-84

19. Skamrova GB, Prylutskiy YuI, Evstigneev MP. Combined effect of electromagnetic radiation, DNA-intercalators, C60 fullerene and caffeine on human buccal epithelium cells. *Biotechnologia Acta*. 2014;7(2):54-62. (In Russ).

20. 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).

21. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr*. 2008;28:313-329.

22. Mironov AN, Bunyatyan ND, Vasiliev AN, Verstakova OL, Zhuravleva MV, Lepakhin VK, et al. *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs*. Moscow: Neck and K; 2012. (In Russ).

23. Timson J. Caffeine. *Mutation Research. Reviews in Genetic Toxicology*. 1977;47:1–52.

24. Hatzi VI, Karakosta M, Barszczewska K, Karachristou I, Pantelias G, Terzoudi GI. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed in vitro by means of the CBMN-assay and iFISH. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2015;793:71-78.

25. Woziwodzka A, Gołuński G, Wyrzykowski D, Kaźmierkiewicz R, Piosik J. Caffeine and Other Methylxanthines as Interceptors of Food-Borne Aromatic Mutagens: Inhibition of Trp-P-1 and Trp-P-2 Mutagenic Activity. *Chemical Research in Toxicology*. 2013;26(11):1660-1673. doi: 10.1021/tx4002513

26. Durnova NA, Karetnikova AYU., Isaev DS, Klantsataya AR, Sheremetyeva AS. 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 (In Russ).

27. Bunting SY, Lapworth DJ, Crane EJ, Grima-Olmedo J, Koroša A, Kuczyńska A, Mali N, Rosenqvist L, van Vliet ME, Togola A, Lopez B. Emerging organic compounds in European groundwater. *Environ Pollut*. 2020;3:115945.

28. Um CY, McCullough ML, Guintier MA, Campbell PT, Jacobs EJ, Gapstur SM. Coffee consumption and risk of colorectal cancer in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol*. 2020;67:101730.

*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, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112. E-mail: ndurnova@mail.ru

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

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

Курчатова М.Н. SPIN: 6056–7784; ORCID: 0000–0003–4432–5555

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

Шереметьева А.С. SPIN: 3755–4410; ORCID: 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, Saratov State Medical University, 410012, Bolshaya Kazachia Str., 112, Saratov, Russia. E-mail: ndurnova@mail.ru

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

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

Kurchatova M.N. ORCID: 0000–0003–4432–5555

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

Sheremetyeva A.S. ORCID: 0000–0002–0022–8318



DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-2-154-161

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ  
CASE REPORT

## Использование современных судебно-медицинских методов посмертной диагностики кровопотери

Д.В. Сундуков<sup>1</sup>, В.А. Путинцев<sup>1,2</sup>, В.В. Шекера<sup>2</sup>, Д.В. Богомолов<sup>1,2</sup>, О.Л. Романова<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Российский центр судебно-медицинской экспертизы, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>Федеральный научный центр реаниматологии и реабилитологии, г. Москва, Российская Федерация

\*olgpharm@yandex.ru

**Аннотация.** В судебно-медицинской практике при диагностике причины смерти от кровопотери довольно часто приходится решать задачи, связанные с этиологией, потерей объема циркулирующей крови (ОЦК), степенью и тяжестью поражения, а также ее ролью в танатогенезе и длительности терминального (агонального) периода. Судебно-следственные органы при расследовании причин смерти от острой кровопотери часто ставят на разрешение экспертам вопросы, связанные с возможностью совершения умирающим активных целенаправленных действий, а также с оценкой своевременности оказания медицинской помощи и действия медицинского персонала. Решение этих вопросов у экспертов довольно часто вызывают затруднение, и связаны они как с объективными, так и субъективными причинами. Например, в случаях, когда обстоятельства наступления смерти неизвестны, или отсутствуют медицинские документы, либо в них не содержится достаточных сведений, без которых не представляется возможным провести ретроспективный клинко-анатомический анализ с целью дифференциальной диагностики между гемолитическим шоком и постгеморрагической анемией. Статья посвящена использованию новых методических подходов в посмертной морфологической диагностике кровопотери по скорости ее развития и роли ее в танатогенезе, в судебно-медицинской практике. На примере конкретной судебно-медицинской экспертизы (случай из практики) показано, что применение двух новых методов позволили решить интересующие следователя вопросы, связанные с причиной смерти и продолжительностью умирания от кровопотери. Владение экспертами новыми методическими подходами к судебно-медицинской диагностике острой кровопотери поможет правоохранительным органам в борьбе с преступлениями против жизни граждан, а также в разработке мероприятий направленных на совершенствование методов профилактики снижения смертности населения от травматических повреждений с кровопотерей.

**Ключевые слова:** кровопотеря, кровотечение, гиповолемический шок, танатогенез, продолжительность умирания, темп наступления смерти

**Вклад авторов:** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

**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.

Поступила 18.12.2020. Принята 11.02.2021.

© Сундуков Д.В., Путинцев В.А., Шекера В.В., Богомолов Д.В., Романова О.Л., 2021



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

**Для цитирования:** *Сундуков Д.В., Путинцев В.А., Шекера В.В., Богомолов Д.В., Романова О.Л.* Использование современных судебно-медицинских методов посмертной диагностики кровопотери // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2021. Т. 25. № 2. С. 154—161. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-154-161

## Use of modern forensic methods for post-mortem diagnosis of blood loss

D.V. Sundukov<sup>1</sup>, V.A. Putintsev<sup>1,2</sup>, V.V. Shekera<sup>2</sup>, D.V. Bogomolov<sup>1,2</sup>, O.L. Romanova<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Russian Federal Centre of Forensic Medical Expertise, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>Federal Clinical and scientific center of Reanimatology and Rehabilitology, Moscow, Russian Federation

\*Corresponding author: olgpharm@yandex.ru

**Annotation.** In forensic medical practice, when diagnosing the cause of death from blood loss, it is often necessary to solve questions related to the etiology of loss of circulating blood volume (CBV), the degree and severity of the injury, as well as its role in thanatogenesis and the duration of the terminal (agonal) period. When investigating the cases of death from acute blood loss, the authorities often ask forensic experts to solve issues related to the possibility of performing active targeted actions by the dying person, as well as to assess the timeliness of medical care and the actions of medical personnel. The solution of these issues is often difficult for experts, and it is associated with both objective and subjective reasons. For example, in cases where the circumstances of death are unknown, or there are no medical documents, or they do not contain sufficient information, without which it is impossible to conduct a retrospective clinical and anatomical analysis for the purpose of differential diagnosis between hemolytic shock and post-hemorrhagic anemia. The article deals with the use of new methodological approaches in postmortem morphological diagnostics of blood loss by the rate of its development and its role in thanatogenesis, in forensic medical practice. For example, a particular forensic expertise (case study) shows that the application of two new methods allowed to solve the issues for the investigator related to the cause of death and duration of dying from blood loss. Experts' knowledge of new methodological approaches to the forensic diagnosis of acute blood loss will help law enforcement authorities to counteract crimes against the life of citizens, as well as to develop the measures to improve the methods for prevention and reduction of mortality from traumatic injuries with blood loss.

**Key words:** blood loss, bleeding, hypovolemic shock, thanatogenesis, duration of dying, rate of death

**Author contribution:** Authors are solely responsible for submitting the final manuscript to print. All authors participated in the development of the concept of the article and the writing of the manuscript. The final version of the manuscript was approved by all authors.

**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.

Received 18.12.2020. Accepted 11.02.2021.

**For citation:** Sundukov DV, Putintsev VA, Shekera VV, Bogomolov DV, Romanova OL. Use of modern forensic methods for post-mortem diagnosis of blood loss. *RUDN Journal of Medicine*. 2021;25(2):154—161. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-2-154-161

### Введение

В судебно-медицинской практике при диагностике причины смерти от кровопотери довольно часто приходится решать задачи, связанные с этиологией, потерей объема циркулирующей крови (ОЦК), степенью и тяжестью поражения, а также ее

роли в танатогенезе и длительности терминального (агонального) периода [1].

Судебно-следственные органы при расследовании причин смерти от острой кровопотери часто ставят на разрешение экспертам вопросы, связанные с возможностью совершения умирающим

активных целенаправленных действий, а также с оценкой своевременности оказания медицинской помощи и действия медицинского персонала [2]. Решение этих вопросов у экспертов довольно часто вызывает затруднение, и связано оно как с объективными, так и субъективными причинами. Например, в случаях, когда обстоятельства наступления смерти неизвестны, или отсутствуют медицинские документы, либо в них не содержится достаточных сведений, без которых не представляется возможным провести ретроспективный клинико-анатомический анализ с целью дифференциальной диагностики между гемолитическим шоком и постгеморрагической анемией.

Острая кровопотеря не является самостоятельной нозологической единицей и не выделяется по МКБ-10. В результате острой кровопотери развиваются гиповолемический шок и острая постгеморрагическая анемия [3, 4]. Оценивать величину кровопотери по представленным информативным медицинским документам возможно только приблизительно, основываясь на некоторые клинические признаки, обширность гематомы и величину средней потери крови при некоторых повреждениях. Приблизительные данные о степени гиповолемии также дают различные пробы (капиллярная, с изменением положения тела и трансфузионная), но точное количество потерянной крови клинически может быть определено только на основании знания ОЦК, содержания гематокрита и дефицита глобулярного объема (ГО). Однако в начальной стадии острог кровотоечения величина гематокрита не меняется, только с течением времени происходит разжижение крови и снижение гематокрита, но не раньше, чем через 8 часов после появления кровотоечения [5]. Установление объема кровопотери морфометрическим методом в ходе проведения аутопсии является точным и объективным, но этого недостаточно, чтобы по одной этой величине решать вопросы, связанные с быстротой ее развития. В связи с этим судебно-медицинские эксперты нередко уходят от решения вопросов, связанных с динамикой развития кровотоечения, объясняя это отсутствием специальных методик, но это не так — они имеются.

## Случай из практики

В своей статье мы хотели бы привести случай из практики, где при проведении повторной судебно-медицинской экспертизы были применены новые современные судебно-медицинские методики [6—12], позволившие решить вопросы, связанные с продолжительностью умирания от кровопотери.

Случай представлен с кодированием причины смерти по МКБ-10, кратким описанием обстоятельства дела, гистологической картины, судебно-медицинского диагноза и ответами на вопросы следствия [13].

Код по МКБ-10: G93.6 | R57 | O90.0 | O82 || J18

а) отек мозга;

б) острая массивная кровопотеря, гиповолемический шок;

в) внутрибрюшное маточное продолжающееся венозное кровотечение, расхождение шва операционной раны в послеродовой (послеоперационный) период от 25.02.19 г.;

г) первые срочные роды, кесарево сечение по Stark от 13.02.19 г.

Подострая двусторонняя пневмония.

*Обстоятельства дела.* У роженицы Л. первые срочные роды 13.02.19 г., была выполнена операция — кесарево сечение по Stark (разрез на матке в нижнем сегменте без отслойки мочевого пузыря). После извлечения плода и отделения плаценты на углы раны наложены отдельные полисорбовые швы, а разрез зашит непрерывным, однорядным швом по Шмидену. На четвертые сутки (25.02.19 г.) после выписки из родильного дома неожиданно наступило ухудшение ее состояния, которое закончилось скоростной смертью. В ходе проведения первичной судебно-медицинской экспертизы была установлена основная причина смерти — внутрибрюшное маточное кровотечение от 25.02.19 г. в результате расхождения послеоперационного шва (кесарево сечение по Stark от 13.02.19 г.) и непосредственная причина ее смерти — острая массивная кровопотеря крайне тяжелой степени, геморрагический шок с развитием отека (гиповолемического) мозга. Однако у следствия остались вопросы о скорости и объеме кровоистечения, продолжительности

постгеморрагического периода и своевременности оказания медицинской помощи гражданке Л.

**Гистологическая картина.** Множественные мелкоочаговые кровоизлияния с формированием эритроцитарных и фибриновых свертков, в том числе с организацией, мелкие очаги некроза, разрастания грануляционной ткани в миометрии с очень слабой мелкоочаговой лимфоплазмодитарно-макрофагальной инфильтрацией. Преимущественное малокровие, микрогемодинамические нарушения в представленных органах. Клетки Краевского в печени. Деструктивный отек головного мозга, некробиотические изменения нейронов. Очаги дис- и ателектаза, эмфиземы, интерстициального отека в легком. Очаги фрагментации, гиперэозинофилии, внутриклеточный отек кардиомиоцитов; отек стромы миокарда. Очаговая делипоидизация коры надпочечника. Очаговая пневмония в стадии разрешения с карнификацией. Мелкоочаговое продуктивное воспаление в коже.

**Судебно-медицинский диагноз.** Основное заболевание. Первые срочные роды, операция — кесарево сечение по Stark от 13.02.19 г. Расхождение операционного шва от 25.02.19 г. в послеродовой (послеоперационный) период. Осложнения. Продолжающееся внутрибрюшное маточное кровотечение (гемоперитонеум 3000 см<sup>3</sup>, гематометра 230 см<sup>3</sup> в виде жидкой крови и сгустка) из венозного сосуда нижнего сегмента матки в области расхождения шва операционной раны. Острая массивная кровопотеря, гиповолемический шок. ДВС-синдром: множественные тромбы в сосудах микроциркуляции внутренних органов. Отек (деструктивный) головного мозга. Сопутствующие заболевания.

## Результаты

Ответы на вопросы следствия «Было ли кровотечение длительным или стремительным у гражданки Л.? Была ли кровопотеря у гражданки Л. по скорости развития острой или подострой?»

Имевшееся кровоистечение у гражданки Л. могло развиваться за 3—5 ч до момента наступления ее смерти, о чем свидетельствуют морфологические признаки (выраженный отек головного мозга, еди-

ничные пикноморфные нейроны, явления сателлитоза и очаговой нейронофагии клеточных элементов с признаками кариолизиса, участки делипоидизации в корковом веществе надпочечника, аутолиз селезенки отсутствует, в других органах скорость его замедлена, выраженность незначительная), соответствующие терминальному периоду (в данном случае продолжительности постгеморрагического периода)  $>2h \leq 6h$ .

Понятие «стремительное кровотечение» как медицинский термин в отечественной и международной научной литературе не существует, однако само слово «стремительное» употребляется в практике русскоговорящими врачами. Его можно отождествлять с понятием «очень быстрое в развитии действие» [14, 15].

Кровопотеря у гражданки Л. была массивной, на что указывает потеря 68 % объема циркулирующей крови ОЦК\*, установленная с помощью морфометрического и математического методов (масса тела (МТ) 67 кг;  $OЦК = МТ \times 7 \% / 100 \% = 67 \times 7 / 100 = 4,69 \text{ л} \approx 4,7 \text{ л}$ ; объем кровопотери «гемоперитонеум 3000 см<sup>3</sup> и гематометра 230 см<sup>3</sup>»  $\approx 3,2 \text{ л}$  и его процентное соотношение к ОЦК 68 %), по защитной реакции организма — кровотечение было продолжающимся, о чем свидетельствуют макроскопические морфологические признаки кровопотери (скопление жидкой крови в брюшной полости с наличием эластичного, студневидного буро-красного цвета свертка крови), а по скорости развития кровопотери — острой, которая характеризуется по интенсивности кровотечения (количество крови, вытекающей за единицу времени), в данном случае более 7 % ОЦК за 1 час, о чем свидетельствует продолжительность ( $> 2h \leq 6h$ ) постгеморрагического периода и потеря 68 % ОЦК».

## Выводы

Последствия кровопотери зависят от многих факторов (скорости и объема кровоистечения, продолжительности постгеморрагического периода и некомпенсированного состояния, количества рецидивов кровотечения, индивидуальной чувстви-

\* ОЦК — объем циркулирующей крови. Средний ОЦК взрослого человека составляет 5—6 л (или 7 % массы тела), из которых 2 л приходится на клеточные элементы — эритроциты, лейкоциты тромбоциты (глобулярный объем) и 3 л плазму (плазматический объем).

тельности к потере крови, возраста \*\* и др.), которые необходимо учитывать не только клиницистам, но судебным медикам в своей профессиональной деятельности. Данный случай из практики наглядно еще раз показал, что использование новых современных судебно-медицинских методик [1, 10,

16] позволяет посмертно (постмортально) решать вопросы, связанные с последствиями кровопотери, и диагностировать кровопотерю по классификации, предложенной д.м.н., проф. Брюсовым П.Г. [17], что было невозможно при использовании классических методов в ходе первичной судебно-медицинской экспертизы (табл. 1).

Табл. 1

Классификация кровопотери (по П.Г. Брюсову, 1998)

По виду	Травматическая Патологическая Искусственная	Раневая, операционная, Заболевания, патологические процессы Экзфузии, лечебные кровопускания
По скорости развития	Острая	Более 7 % ОЦК за 1 час
	Подострая	5–7 % ОЦК за 1 час
	Хроническая	Менее 5 % ОЦК за 1 час
По объему	Малая	0,5–10 % ОЦК (0,5 л)
	Средняя	11–20 % ОЦК (0,5–1 л)
	Большая (обильная)	21–40 % ОЦК (1–2 л)
	Массивная	41–70 % ОЦК (2–3,5 л)
По степени гиповолемии и возможности развития шока	Смертельная	Более 70 % ОЦК (> 3 л)
	Легкая	Дефицит ОЦК 10–20 %, дефицит ГО < 30 %, шока нет
	Умеренная	Дефицит ОЦК 21–30 %, дефицит ГО 30–45 %, шок развивается при длительной гиповолемии
	Тяжелая	Дефицит ОЦК 31–40 %, дефицит ГО 46–60 %, шок неизбежен
	Крайне тяжелая	Дефицит ОЦК > 40 %, дефицит ГО > 60 %, шок, терминальное состояние

Table 1

Classification of blood loss (according to P.G. Bryusov, 1998)

According to the origin	Traumatic Pathological Artificial	Wound, surgery, Diseases, pathological processes Exfusion, curative bloodletting
According to the rate of the development development	Acute	More than 7 % of blood volume per hour
	Subacute	5–7 % of blood volume per hour
	Chronic	Less than 5 % of blood volume per hour
According to the volume	Mild	0,5–10 % of blood volume per hour (0,5 l.)
	Moderate	11–20 % of blood volume per hour (0,5–1 l.)
	Severe	21–40 % of blood volume per hour (1–2 l.)
	Massive	41–70 % of blood volume per hour (2–3,5 l.)
	Lethal	More than 70 % of blood volume per hour (> 3 l.)

\*\*Сенека по приказу Нерона был приговорен к смерти с правом выбора способа самоубийства. Сенека, который был уже стар (70 лет), хладнокровно вскрыл себе вены на руках и ногах, поскольку кровь текла очень медленно, он лег в теплую ванну, чтобы ускорить ее истечение. Ученики записывали последние слова философа, которые он говорил до тех пор, пока смерть не унесла его.

According to the origin	Traumatic Pathological Artificial	Wound, surgery, Diseases, pathological processes Exfusion, curative bloodletting
According to the degree of hypovolemia and the possibility of shock development	Mild	Deficit of blood volume 10–20 %, Deficit of globular volume < 30 %, no shock develops
	Moderate	Deficit of blood volume 21–30 %, Deficit of globular volume 30–45 %, shock develops in case of long-lasting hypovolemia
	Severe	Deficit of blood volume 31–40 %, Deficit of globular volume 46–60 %, shock is unavoidable
	Extremely severe	Deficit of blood volume > 40 %, Deficit of globular volume > 60 %, shock develops, terminal condition

Необходимо также отметить, что проведенный танатогенетический анализ [11, 12] в ходе проведения повторной судебно-медицинской экспертизы по материалам дела с целью дифференциальной диагностики между гемолитическим шоком и постгеморрагической анемией, подтвердил ранее установленную непосредственную причину смерти.

В своей статье мы также хотим обратить внимание на то, что судебно-медицинские эксперты должны быть хорошо информированы о современных методах диагностики, применяемых в судебно-медицинской танатологии, не ограничиваясь классическими неточными методами.

### Библиографический список

1. Пиголкин Ю.И., Путинцев В.А., Богомолов Д.В., Должанский О.В. Установление длительности умирания от кровопотери по морфологическим признакам // *Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы судебной медицины»*. Москва. 27–28 марта 2018 г. М., 2018. С.104–105.
2. Ковалев А.В. Порядок проведения судебно-медицинских экспертиз и установление причинно-следственных связей по факту неоказания или ненадлежащего оказания медицинской помощи: методические рекомендации. М.: ФГБУ РЦСМЭ // 2017. 32 с.
3. Серов В.В., Пальцев М.А., Ганзен Т.Н. Руководство к практическим занятиям по патологической анатомии. М.: Медицина, 1997. 544 с.
4. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. Десятый пересмотр (МКБ-10). Пер. с англ. Т. 1–3. М., 1995–1998.
5. Руководство по военно-полевой хирургии для медицинских служб армий государств-участников Варшавского договора / Под ред. Ю.Г. Шапошников. М.: Военное издательство МО РФ, 1981. 122 с.
6. Богомолов Д.В., Богомолова И.Н., Должанский О.В. Установление механизма наступления смерти при судебно-медицинском исследовании трупа // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2005. Т. 48. № 6. С. 9–12.
7. Богомолов Д.В., Богомолова И.Н., Путинцев В.А., и др. Судебно-медицинская диагностика причины смерти и установление танатогенеза морфологическими признаками: методические рекомендации. М.: ФГБУ РЦСМЭ, 2012.
8. Путинцев В.А., Богомолов Д.В., Богомолова И.Н., Денисова О.П. Определение длительности и темпа умирания по морфологическим признакам: методические рекомендации. М.: ФГБУ РЦСМЭ. 2017. 32 с.
9. Путинцев В.А., Богомолов Д.В., Сундуков Д.В. Морфологические признаки различных темпов наступления смерти // *Общая реаниматология*. 2018. Т. 14. № 4. С. 35–43.
10. Путинцев В.А. Судебно-медицинская оценка динамики гистоморфологических изменений внутренних органов при критических и терминальных состояниях: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2019. 38 с.
11. Джувалыков П.Г., Богомолов Д.В., Збруева Ю.В., Кабакова С.С. Танатогенетический анализ в патологии и судебной медицине. Астрахань, 2016. 107 с.
12. Джувалыков П.Г., Збруева Ю.В., Джувалыков Д.В., и др. Судебно-медицинская оценка типа и темпа танатогенеза при некоторых видах смерти: практикум по судебной медицине. Астрахань: Астраханский государственный медицинский университет, 2017. 51 с.
13. Ковалев А.В., Макаров И.Ю., Куприна Т.А., и др. Основные принципы формулирования судебно-медицинского диагноза. М., 2017. 74 с.
14. Ожегов С.И., Шведов Н.Ю. Толковый словарь русского языка: 80 000 слов и фразеологических выражений. М.: Азбуковник, 1997. С.773.
15. Энциклопедический словарь медицинских терминов: в 3-х томах / под ред. Б.В. Петровского. М.: Советская энциклопедия, 1983. Т. 2. С. 84–85.
16. Тесленко О.В., Шершевский А.Л., Эделев И.С. Судебно-медицинское значение морфологии почек при определении темпа умирания // *Достижения российской судебно-медицинской науки XX–XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ. Труды VIII Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием*, Москва 21–23 ноября 2018 г. / Под общ. ред. А.В. Ковалева. Т. 1. М.: Принт, 2019. С. 195–198.
17. Брюсов П.Г. Определение величины кровопотери в неотложной хирургии // *Вестник хирургии*. 1986. № 6. С. 122–127.

## References

1. Pigolkin YuI, Putintsev VA, Bogomolov DV, Dolzhansky OV. Determination of the duration of dying from blood loss by morphological signs. *Materials of the scientific-practical conference "Actual problems of forensic medicine"*. Moscow. 27–28 Mar. 2018. Moscow. 2018: 104–105. (In Russ.)
2. Kovalev AV. *The procedure for conducting forensic medical examinations and establishing cause-and-effect relationships on the fact of non-provision or improper provision of medical care: methodological recommendations*. Moscow. FGBU RCSME. 2017: 32 p. (In Russ.)
3. Serov VV, Palstov MA, Ganzen TN. Guide to practical classes in pathological anatomy. Moscow. Meditsina; 1997: 544 p. (In Russ.)
4. *International Statistical Classification of Diseases and Health-related Problems*. Tenth revision (ICD-10). 1-3. Moscow. 1995-1998. (In Russ.)
5. *A manual of military surgery for the medical services of the armies of the States parties to the Warsaw Pact*. Ed. by J.G. Shaposhnikov. Moscow. Military publishing house of Defense Ministry. 1981:122. (In Russ.)
6. Bogomolov DV, Bogomolova IN, Dolzhansky OV. Establishing the mechanism of death in the forensic medical examination of a corpse. *Forensic-medical expertise*. 2005;48(6):9-12. (In Russ.)
7. Bogomolov DV, Bogomolova IN, Putintsev VA, et al. *Forensic medical diagnostics of the cause of death and the establishment of thanatogenesis by morphological signs: methodological recommendations*. M.: FGBU RC SME; 2012. (In Russ.)
8. Putintsev VA, Bogomolov DV, Bogomolova IN, Denisova OP. *Determination of the duration and rate of dying by morphological characteristics: guidelines*. Moscow. FGBU RCSME. 2017:32. (In Russ.)
9. Putincev VA, Bogomolov DV, Sundukov DV. Morphological Characteristics of Different Rates of Dying. *General Reanimatology*. 2018;14(4):35-43. (In Russ) doi: 10.15360/1813-9779-2018-4-35-43
10. Putintsev VA. *Forensic medical assessment of the dynamics of histomorphological changes in internal organs in critical and terminal conditions*. PhD Thesis. Moscow. 2019. 38 p. (In Russ.)
11. Dzhuvalyakov PG, Bogomolov DV, Zbrueva YuV, Kabakova SS. *Thanatogenetic analysis in pathology and forensic medicine*. Astrakhan, 2016;107. (In Russ.)
12. Dzhuvalyakov PG, Zbrueva YuV, Dzhuvalyakov DV, et al. *Forensic medical assessment of the type and rate of thanatogenesis in some kinds of death: practicum on forensic medicine*. Astrakhan. Astrakhan State Medical University. 2017;51. (In Russ.)
13. Kovalev AV, Makarov IYu, Kuprina TA, et al. *Basic principles of a forensic medical diagnosis formulation*. Moscow. 2017:74. (In Russ.)
14. Ozhegov SI, Shvedov NYu. *Russian Explanatory Dictionary: 80,000 words and phraseological expressions*. Moscow. Azbukovnik. 1997: 73. (In Russ.)
15. *Encyclopedic dictionary of medical terms: in 3 volumes*. Edited by B. V. Petrovsky. T.2. M.; Sovetskaya entsiklopediya; 1983: 84–85. (In Russ.)
16. Teslenko OV, Shershevsky AL, Edelev IS. Forensic significance of kidney morphology in determining the rate of death. *Materials of Congress of forensic physicians with international participation*. Moscow, 21–23 Nov. 2018. Moscow. 2019:195–198. (In Russ.)
17. Bryusov PG. Determination of the amount of blood loss in emergency surgery. *Vestnik khirurgii*.1986;6:122-127 (In Russ.).

*Ответственный за переписку:* Романова Ольга Леонидовна — доцент кафедры судебной медицины, кандидат биологических наук, Российский Университет дружбы народов, 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 10, корп. 2, г. Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории патологии клетки при критических состояниях, НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Российская Федерация, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, корп. 2; E-mail:olgpharm@yandex.ru

Сундуков Д.В. SPIN: 2968–7961; ORCID: 0000–0001–8173–8944

Путинцев В.А. SPIN: 9419–5554; ORCID: 0000–0003–0948–0496

Шекера В.В. SPIN: 2134–1140; ORCID: 0000–0002–4129–5007

Богомолов Д.В. SPIN: 2777–2674; ORCID: 0000–0002–9061–3569

Романова О.Л. SPIN: 6727–9170; ORCID: 0000–0001–6356–9251

*Corresponding author:* Olga Romanova-associate Professor of the Department of forensic medicine, PhD, RUDN University, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 10, bld. 2; senior researcher at the laboratory of cell pathology in critical conditions, Institute of General resuscitation named after V.A. Negovsky Federal state budgetary scientific institution «Federal scientific and clinical center of reanimatology and rehabilitation», 107031, Petrovka str., 25, bldg. 2, Moscow, Russia. E-mail: olgpharm@yandex.ru

Sundukov D.V. ORCID: 0000–0001–8173–8944

Putintsev V.A. ORCID: 0000–0003–0948–0496

Shekera V.V. ORCID: 0000–0002–4129–5007

Bogomolov D.V. ORCID: 0000–0002–9061–3569

Romanova O.L. ORCID: 0000–0001–6356–9251