



РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ

**Вестник Российского университета дружбы народов.
Серия: МЕДИЦИНА**

2023 Том 27 № 4

Тема номера: ФИЗИОЛОГИЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4

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

Научный журнал

Издается с 1997 г.

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

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор

КОБАЛАВА Жанна Давидовна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая кафедрой внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики имени В.С. Моисеева Медицинского института, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

Ответственный секретарь

ГУРЬЯНОВА Светлана Владимировна, к.б.н., доцент, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

Члены редакционной коллегии

АБРАМОВ Алексей Юрьевич д.м.н., профессор, директор Медицинского института, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

АЗОВА Мадина Мухамедовна, д.б.н., профессор, кафедра биологии и общей генетики, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

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

АНИСИМОВ Владимир Николаевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела канцерогенеза и онкогеронтологии, лаборатории канцерогенеза и старения, НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, Россия

БАХНА Сами, профессор, Университет Луизианны, Шreveпорт, США

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

БЫКОВ Илья Михайлович, д.м.н., профессор, кафедра фундаментальной и клинической биохимии, Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия

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

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

ВУКСАНОВИЧ Александр, д.м.н., профессор, профессор Медицинского факультета Университета г. Белград, Белград, Сербия

ГАБИБОВ Александр Габирович, академик РАН, д.х.н, профессор, директор Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

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

ДРАПКИНА Оксана Михайловна, д.м.н., профессор, академик РАН, директор Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины, г. Москва, Россия

ЕЛЬЧАНИНОВ Андрей Владимирович, д.м.н., профессор, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, г. Москва, Россия

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

КАНОНИКА Вальтер, д.м.н., профессор, Директор Центра персонализированной медицины в исследовательской больнице, г. Роззано, г. Милан, Италия

КОСТИН Андрей Александрович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, кафедра урологии с курсами онкологии, радиологии и андрологии, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

КУСТОВИЧ Аднан, профессор, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания

МЕРКЭЛИ Бела, профессор, директор Кардиоцентра Университета Земмельвейса, г. Будапешт, Венгрия

НАПАРСТЕК Яаков, профессор, Университет Хадасса, Иерусалим, Израиль

НОЙХАУС Йохен, д.б.н., профессор, Лейпцигский университет, заведующий научно-исследовательской лабораторией кафедры урологии, г. Лейпциг, Германия

ПОЛЕВИЩИКОВ Александр Витальевич, д.б.н., профессор, заведующий отделом иммунологии Института экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия

РЕЙМЮЛЛЕР Райнер, д.м.н., профессор, Медицинский университет, кафедра радиологии, г. Грац, Австрия

РОДИН Сергей Александрович, д.б.н., профессор, старший научный сотрудник отделения хирургических наук Университета г. Упсала, г. Упсала, Швеция

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

ТИМАНН Маркус, д.м.н., профессор, Институт гематопатологии, г. Гамбург, Германия

ФАТХУДИНОВ Тимур Хайсамудинович, д.м.н., профессор, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

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

ХЕ Джи, д.м.н., профессор, Онкологический институт и больница, Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза, Пекин, Китай



RUDN University

RUDN JOURNAL OF MEDICINE

2023 Volume 27 No. 4

Theme of the issue: PHYSIOLOGY. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4

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

Founded in 1997

Founder: Peoples' Friendship University of Russia Named After Patrice Lumumba

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Zhanna D. KOBALAVA, MD, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Internal Medicine with a course of cardiology and functional diagnostics named after V.S. Moiseev Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Executive Secretary

Svetlana V. GURYANOVA, Ph.D., Associate Professor, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Members of Editorial Board

Aleksey Y. ABRAMOV, MD, Professor, Director of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

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

Vladimir N. ANISIMOV, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Carcinogenesis and Oncogerontology and the Laboratory of Carcinogenesis and Aging of the Research Institute of Oncology n.a. N.N. Petrov, St. Petersburg, Russia

Madina M. AZOVA, D. Sc., Professor, Department of Biology and General Genetics, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

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

Mikhail L. BLAGONRAVOV, MD, Professor, Frolov Department of General Pathology and Pathological Physiology, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

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

Walter CANONICA, MD, Professor, Director of the Center for Personalized Medicine at the Research Hospital Humanitas IRCCS, Rozzano, Milan, Italy

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

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

Oksana M. DRAPKINA, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine, 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

Andrey V. ELCHANINOV, MD, Professor, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Timur Kh. FATKHUDINOV, MD, Professor, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russia

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

Jie HE, Professor, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, China

Jochen NEUHAUS, PhD, Professor, University of Leipzig, Head of Research Laboratory, Department of Urology, Leipzig, Germany

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

Andrei A. KOSTIN, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Urology with courses oncology, radiology and andrology, the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

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

Yakov NAPARSTEK, MD, Professor, Director of the Hadassah Center for Clinical Immunology and Rheumatology at the Hadassah University Medical Center, Jerusalem, Israel

Alexander V. POLEVSHCHIKOV, D.Sc, Professor, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Rainer RIENMUELLER, MD, Professor Medical University, Department of Radiology, Graz, Austria

Sergey A. RODIN, PhD, Professor, Senior Researcher, Department of Surgical Sciences, Uppsala. University, Uppsala, Sweden

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

Markus TIEMANN, MD, Professor, Institute of Hematopathology, Hamburg, German

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

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

Alexander VUKSANOVICH, MD, Professor, Professor of the Medical Faculty of the University, Belgrade, Serbia

Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: МЕДИЦИНА

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

Периодичность: 4 выпуска в год (ежеквартально).

Входит в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ.

Языки: русский, английский.

Материалы журнала размещаются на платформе РИНЦ Российской научной электронной библиотеки, Scopus, Научной электронной библиотеки КиберЛенинка, Directory of Open Access Journals (DOAJ).

Цели, задачи и тематика журнала

Научный 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 двух языках одновременно.

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, аспирантов и молодых ученых, практических врачей, ведущих поисковые работы по разработке новых и по усовершенствованию существующих профилактических, диагностических, лечебных и реабилитационных методов.

На основании решения 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 по специальностям: с 01.02.22 — 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки), 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки), 3.1.18. Внутренние болезни (медицинские науки), 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки); с 22.11.22 — 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки), 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки), 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки), 3.1.20. Кардиология (медицинские науки), 3.1.31. Геронтология и гериатрия (медицинские науки), 3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские науки), 3.2.7. Аллергология и иммунология (биологические науки)».

Редакционная коллегия журнала приглашает к сотрудничеству ученых и научные коллективы по подготовке специальных тематических выпусков журнала: <http://journals.rudn.ru/medicine/announcement/view/327>

Электронный адрес: 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

Почтовый адрес редакции

ул. Миклухо-Маклая, д. 10, Москва, Россия, 117198

e-mail: medj@rudn.ru

Подписано в печать 26.12.2023. Выход в свет 29.12.2023. Формат 70×100/16.

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

Усл. печ. л. 10,5. Тираж 500 экз. Заказ № 1604. Цена свободная.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)

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

Отпечатано в типографии ИПК РУДН

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

тел. +7 (495) 952-04-41; publishing@rudn.ru

RUDN Journal of Medicine

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

Publication frequency: 4 issues per year (quarterly)

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, Scopus, Electronic Journals Library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals (DOAJ).

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.

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, lecturers, graduate students and young scientists, practitioners who do research to develop new and improve existing preventive, diagnostic, therapeutic and rehabilitation methods.

The Editorial Board of the journal encourages individual researches and research teams to collaborate in preparing issues devoted to specific topics: <http://journals.rudn.ru/medicine/announcement/view/327>

Contact e-mail: medj@rudn.ru

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

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

Postal Address of the Editorial Board:
Miklukho-Maklaya str., 10, Moscow, Russia, 117198
e-mail: medj@rudn.ru

Printing run 500 copies. Open price.

Peoples' Friendship University of Russia Named After Patrice Lumumba (RUDN University)
6 Miklukho-Maklaya str., 117198 Moscow, Russian Federation

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

СОДЕРЖАНИЕ**ТЕМА НОМЕРА: ФИЗИОЛОГИЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ**

Гребенников Е.К., Гребенникова И.Н., Суботялова А.М., Суботялов М.А. История авиационной физиологии.....	411
Sorout J., Kacker S., Saboo N., Kumar M. Blood pressure status in patients with metabolic syndrome (Состояние артериального давления у пациентов с метаболическим синдромом)	419
Dhunputh N., Petrova M.V., Moroz V.V., Butrov A.V., Magomedov M.A. Monitoring of Neuromuscular block during emergency abdominal surgery (Мониторинг нейро-мышечного блока при экстренной абдоминальной хирургии).....	428
Mamedov A.T., Gantsova E.A., Kiseleva V.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Turygina S.A., Bicherova I.A., Arutyunyan I.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. Macrophage population state and proliferative activity of spleen cells under liver regeneration conditions (Состояние макрофагальной популяции и пролиферативная активность клеток селезенки в условиях регенерации печени)	441
Grinberg M.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Kananykhina E.Yu., Eremina I.Z., Glinkina V.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. Migration, proliferation and cell death of macrophages in regenerating liver in mice in an experimental model (Миграция, пролиферация и клеточная гибель макрофагов регенерирующей печени в экспериментальной модели)	449
Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Denisov E.V. Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas. (Экспериментальные модели опухолевого роста при саркомах мягких тканей)	459

ИММУНОЛОГИЯ

Guryanova S.V., Sigmatulin I.A., Gigani O.O., Lipkina S.A. Mechanisms of regulation allergic and autoimmune reactions by bacterial origin bioregulators (Механизмы регуляции аллергических и аутоиммунных реакций биорегуляторами бактериального происхождения).....	470
--	-----

ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ

Абрамов А.Ю., Муравьёва А.А., Михайлова Ю.В., Стерликов С.А. Эпидемиология цереброваскулярных заболеваний у сельских жителей Ставропольского края в контексте реализации краевой программы «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае»	483
Милованов С.С. Выбор параметров и показателей клинических центров при прогнозировании набора пациентов для клинических исследований	496

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Васильев С.А., Васильева О.Ю., Оппонг-Пепрах Б., Деменова В.В., Зуев А.С., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Толмачева Е.Н. Нарушения метилирования генов PRDM16 и RTPRN2 в ворсинах хориона при невынашивании беременности.....	515
--	-----

CONTENTS

TEMA HOMEPA: PHYSIOLOGY. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY

Grebennikov E.K., Grebennikova I.N., Subotyalova A.M., Subotyalov M.A. History of aviation physiology.....	411
Sorout J., Kacker S., Saboo N., Kumar M. Blood pressure status in patients with metabolic syndrome	419
Dhunputh N., Petrova M.V., Moroz V.V., Butrov A.V., Magomedov M.A. Monitoring of Neuromuscular block during emergency abdominal surgery.....	428
Mamedov A.T., Gantsova E.A., Kiseleva V.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Turygina S.A., Bicherova I.A., Arutyunyan I.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. Macrophage population state and proliferative activity of spleen cells under liver regeneration conditions	441
Grinberg M.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Kananykhina E.Yu., Eremina I.Z., Glinkina V.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. Migration, proliferation and cell death of macrophages in regenerating liver in mice in an experimental model....	449
Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Denisov E.V. Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas	459

IMMUNOLOGY

Guryanova S.V., Sigmatulin I.A., Gigani O.O., Lipkina S.A. Mechanisms of regulation allergic and autoimmune reactions by bacterial origin bioregulators	470
---	-----

HEALTH POLICY AND PUBLIC HEALTH

Abramov A.Y., Muravyeva A.A., Mikhaylova Yu.V., Sterlikov S.A. Cerebrovascular diseases epidemiology in the Stavropol region rural residents in the implementation context of the regional program “Fighting mediavascular diseases in the Stavropol region	483
Milovanov S.S. Parameters and indicators selection of clinical centers in predicting the patients enrollmentfor for clinical trials ..	496

MEDICAL GENETICS

Vasilyev S.A., Vasilyeva O.Yu., Oppong-Peprah B., Demeneva V.V., Zuev A.S., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Tolmacheva E.N. Abnormal methylation of PRDM16 and PTPRN2 genes in chorionic villi in miscarriage.....	515
---	-----




**ТЕМА НОМЕРА:
ФИЗИОЛОГИЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ
THEME OF THE ISSUE:
PHYSIOLOGY. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY**

DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-411-418
EDN: CSWYMC

REVIEW
ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

История авиационной физиологии

Е.К. Гребенников , **И.Н. Гребенникова** ,
А.М. Суботялова , **М.А. Суботялов**  

Новосибирский государственный педагогический университет г. Новосибирск, Российская Федерация
 subotyalov@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* В изучении истории медицинских и биологических дисциплин важную часть составляет выявление этапов их становления и развития. В связи с этим представляется важным сделать историко-научный аналитический обзор развития представлений об авиационной физиологии, охватывающий разные этапы истории науки и отражающий вклад исследователей разных регионов, который будет полезным для преподавания историко-научных и специальных дисциплин, а также для исследователей, занимающихся изучением авиационной физиологии. Необходимость понимания того, как функционирует организм человека в полете, возникла вместе с развитием воздухоплавания. Статья посвящена анализу основных этапов развития авиационной физиологии. *Цель исследования* — дать характеристику этапам становления и развития авиационной физиологии. *Методы исследования.* При подготовке настоящей публикации использовались преимущественно статьи в изданиях, включенных в РИНЦ, PubMed, Scopus. Предпочтение было отдано материалам, опубликованным в последние 15 лет. *Основные результаты* заключаются в представлении этапов развития авиационной физиологии с описанием вклада основных исследователей в этой области. Проанализированы достижения отечественных учёных, врачей, физиологов И.М. Сеченова, Л.А. Орбели, Г.М. Зараковского, представлены их научные приоритеты в развитии данного научного направления. В заключении представлен вывод о процессе становления и развития авиационной физиологии как направления медико-биологических знаний. До появления авиации (XIX век) происходило исследование гипоксии при изучении полетов на воздушных шарах. С появлением скоростных и маневренных самолетов авиационная физиология начала изучать реакцию организма на перегрузки,

© Гребенников Е.К., Гребенникова И.Н., Суботялова А.М., Суботялов М.А., 2023



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

вызванные высокоманевренными полетами. **Выводы.** В развитии авиационной физиологии можно условно выделить два этапа. 1. Доавиационный, в рамках которого происходит зарождение этой области медико-биологических знаний. 2. Авиационный, на данном этапе у ученых появилась возможность исследовать множественные и разнонаправленные перегрузки и влияние их на организм человека. В настоящее время авиационная физиология является одним из важных разделов физиологии, а также авиационной и космической медицины.

Ключевые слова: история науки, история медицины, история физиологии, авиационная физиология

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Вклад авторов. Гребенников Е.К., Гребенникова И.Н., Суботялова А.М., Суботялов М.А. — дизайн исследования, сбор и обработка материала, обзор по теме публикации, написание работы, окончательное утверждение версии для публикации. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.


Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 16.10.2023. Принята 14.11.2023.

Для цитирования: Гребенников Е.К., Гребенникова И.Н., Суботялова А.М., Суботялов М.А. История авиационной физиологии // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. No 3. С. 411–418. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-411-418

History of aviation physiology

Egor K. Grebennikov , Inna N. Grebennikova ,
Anna M. Subotyalova , Mikhail A. Subotyalov  

Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation
 subotyalov@yandex.ru

Abstract. Relevance. In studying the history of medical and biological disciplines, an important part is the identification of the stages of their formation and development. In this regard, it seems important to make a historical and scientific analytical review of the development of ideas about aviation physiology, covering different stages of the history of science and reflecting the contribution of researchers from different regions. It will be useful for teaching historical and scientific and special disciplines, as well as for researchers involved in the study of aviation physiology. The need to understand how the human body functions in flight arose along with the development of aeronautics. The study is devoted to the analysis of the main stages in the development of aviation physiology. The *purpose* of the study – to characterize the stages of formation and development of aviation physiology. *Research methods.* In preparing this publication, articles in publications included in the RSCI, PubMed, and Scopus were mainly used. Preference was given to materials published in the last 15 years. The *main results* present the stages of development of aviation physiology with a description of the contribution of the main researchers in this field. The achievements of domestic

scientists, doctors, physiologists I.M. Sechenov, L.A. Orbeli, G.M. Zarakovsky are analyzed, their scientific priorities in the development of this scientific direction are presented. The process of formation and development of aviation physiology as a direction of biomedical knowledge is presented. Before the advent of aviation (19th century), hypoxia was studied in the study of balloon flights. With the advent of high-speed and maneuverable aircraft, aviation physiology began to study the body's response to overloads caused by highly maneuverable flights. *Conclusion.* The development of aviation physiology can be divided into two stages. 1. Pre-aviation, within which the emergence of this area of medico-biological knowledge takes place. 2. Aviation, at this stage scientists have the opportunity to study different multidirectional overloads and their effect on the human body. Currently, aviation physiology is one of the important branches of physiology, aviation and space medicine.

Keywords: history of science, history of medicine, history of physiology, aviation physiology

Funding. The authors claim that there is no funding for the preparation of the article.

Author contributions. Grebennikov E.K., Grebennikova I.N., Subotyalova A.M., Subotyalov M.A. — collecting material, processing, and analyzing material, writing text. All authors made a significant contribution to the development of the concept and writing the article, read and approved the final version before publication.

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

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 16.10.2023. Accepted 14.11.2023.

For citation: Grebennikov EK, Grebennikova IN, Subotyalova AM, Subotyalov MA. History of aviation physiology. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(3): 411–418. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–411–418

Введение

Необходимость понимания того, как функционирует организм человека в полете, возникла вместе с развитием воздухоплавания. В изучении истории медицинских и биологических дисциплин важную часть составляет выявление этапов их становления и развития. В связи с этим представляется важным сделать историко-научный аналитический обзор развития представлений об авиационной физиологии, охватывающий разные этапы истории науки и отражающий вклад исследователей разных регионов, который будет полезным для преподавания историко-научных и специальных дисциплин, а также для исследователей, занимающихся изучением авиационной физиологии.

Цель исследования — дать характеристику этапам становления и развития авиационной физиологии.

Методы исследования

При подготовке настоящей публикации использовались преимущественно статьи в изданиях, включенных в РИНЦ, PubMed, Scopus. Предпочтение было отдано материалам, опубликованным в последние 15 лет.

Результаты исследования

Французский физиолог Поль Бер (Paul Bert, 1833–1886) написал работу, в которой установил понятие парциального давления кислорода как физиологического параметра, влияющего на организм. Защита человека, находящегося во время полета на большой высоте, учитывает это понятие, изменяя либо давление, окружающее тело, либо долю кислорода во вдыхаемых газах [1].

В 1862 г. английские воздухоплаватель Хенри Трейси Коксуэлл (Henry Tracey Coxwell, 1819–1900) и аэронавт Джеймс Глейшер (James Glaisher, 1809–1903) совершили подъём на воздушном шаре на высоту более 8800 м. Оба испытали временный паралич конечностей, а также слепоту. Позднее некоторые исследователи пытались объяснить это декомпрессионной болезнью (ДКБ). Другие предполагали, что паралич конечностей Глейшера и Коксуэлла и изменения зрения (слепота) вряд ли были вызваны ДКБ, поскольку «ДКБ спинного мозга крайне редко встречается у летчиков (если это вообще происходит)» и «визуальные изменения, скорее всего, были связаны с гипоксемией и/или гипотензией» [2].

Несмотря на опасность жизням ученых, этот полет способствовал росту исследовательского интереса к проблеме влияния изменения высоты и перепадов давления на организм человека.

Работы великого отечественного ученого Ивана Михайловича Сеченова (1829–1905) по газообмену и растворению газов в жидкостях заложили основы будущей авиационной, а затем космической физиологии и медицины. Его фундаментальные труды посвящены изучению взаимодействий систем анализаторов при решении задачи пространственной ориентации человека в условиях полета, разработке нейрогенной теории утомления [3]. Его изучение альвеолярного воздуха имело исключительное значение для возникновения и развития летного и водолазного дела [4]. Идеи Сеченова имели важное значение для дальнейших исследований по повышению эффективности выполнения и безопасности авиационных и космических полетов.

Работы немецкого физиолога Натана Цунца (Zuntz Nathan, 1847–1920) охватывали широкий спектр областей исследований; основными направлениями были метаболизм, питание, дыхание, газы крови, физические упражнения и физиология высокогорья. Цунц был первым, кто описал разницу между лабораторными данными, полученными в гипобарической камере, и измерениями на большой высоте. В 1902 г. он вместе со своим учеником, австрийским физиологом Антоном Шрёттером

(Anton Hermann Victor Thomas Schrötter, 1870–1928), провел две экспедиции на воздушном шаре, которые ознаменовали собой переход от земной физиологии к авиационной медицине. Авиационный союз, армия и научные ведомства были тесно связаны друг с другом. В сотрудничестве с этими учреждениями Цунц и Шрёттер построили систему подачи кислорода и спроектировали герметичную кабину для полетов на высотах более 10 000 м [5].

В СССР в 1930 г. на базе Центральной психофизиологической лаборатории (ЦПФЛ) был создан авиационный сектор Научно-исследовательского санитарного института РККА. В 1935 г. сектор преобразовали в Авиационный научно-исследовательский санитарный институт, переименованный позднее в Институт авиационной медицины (ИАМ) ВВС им И.П. Павлова. Центр занимался решением проблем, связанных с обеспечением жизнедеятельности, работоспособности и безопасности человека во время полета. Круг данных проблем был довольно широк: кислородное голодание организма человека и способы его профилактики и защиты летного состава; переносимость ускорений в зависимости от направления их действия; влияние факторов полета на функции анализаторских систем и т. д. Эти исследования помогли получить и обобщить данные о психофизиологических возможностях летчиков и разработать методы их адаптации к высотным полетам и перепадам давления, что особенно было важно в послевоенные годы, когда получила развитие реактивная авиация. В настоящее время Центр продолжает исследования психофизиологических проблем специалистов в авиационной сфере с целью обеспечения их профессиональной надежности [6].

В начале 1930-х гг. отечественный физиолог Леон Абгарович Орбели (1882–1958) и его сотрудники проводили исследования в области физиологии высотного полета, что в дальнейшем позволило стратонавтам совершить в 1933 году подъем на высоту 18600 м. Во время Великой Отечественной войны при кафедре физиологии Военно-медицинской академии была создана Лаборатория авиационной медицины, общее руководство которой взял на себя

Орбели. В этой лаборатории были осуществлены важные исследования по изучению влияния ускорений и резких изменений атмосферного давления на человеческий организм [7].

Норвежский врач Карл Вильгельм Сем-Якобсен (Carl Wilhelm Sem-Jacobsen, 1912–1991) стал пионером исследований глубокой стимуляции мозга и аэрокосмической нейрофизиологии. Он сконструировал свои собственные медицинские технические устройства, одним из первых разработал глубокую стимуляцию мозга и создал самые миниатюрные из когда-либо существовавших ранее систем записи ЭЭГ и ЭКГ. В главной психиатрической больнице Осло Сем-Якобсен организовал собственный нейрофизиологический институт для исследований в области нейрохирургии, глубоких записей мозга и глубокой стимуляции мозга. В сотрудничестве с опытными нейрохирургами Осло Сем-Якобсен провел самые первые испытания глубокой стимуляции мозга у пациентов с болезнью Паркинсона. По-видимому, еще в 1950-х гг. он уже пробовал применять субталамическую стимуляцию [8].

История профилактики гипоксии тесно связана с авиационной физиологией. Когда самолеты стали летать выше 3 км, гипоксия пилотов, влияющая на их производительность, становилась все более серьезной проблемой. Незадолго до Второй мировой войны американские врачи Уолтер М. Бутби (Walter M Boothby, 1880–1953) и Уильям Рэндольф Лавлейс II (William Randolph Lovelace II, 1907–1965) и американский хирург Артур Х. Булбулян (Arthur H. Bulbulian, 1900–1996) разработали специальную маску, которая должна была помочь преодолеть низкое парциальное давление кислорода во вдыхаемом воздухе [9].

Во время Второй мировой войны пилоты разных стран продолжали сталкиваться с проблемами, связанными с быстрым изменением высоты и перепадами давления. Описываются случаи преходящей слепоты. Один из пилотов после гипоксии был поднят на высоту 11 582 м. «У него появились небольшие изгибы в плечах, он стал невосприимчивым и нескоординированным. Спуск производился в течение семи минут, и он

был сбит с толку. Примерно через пять-десять минут он пришел в сознание, но жаловался на полную слепоту, которая полностью прошла в следующие пятнадцать-тридцать минут. Фундаментальных изменений обнаружено не было...» Другой пилот пребывал примерно на той же высоте и «по-видимому, находился без сознания в течение двадцати минут. У него был крайне тяжелый шок... и он был слеп в течение дня, с постепенным возвращением зрения в течение следующих четырех суток. На полях его сетчатки отмечалось заметное артериальное сужение» [2].

Потеря сознания у пилотов во время быстрого набора высоты была одной из серьезнейших проблем. К великому сожалению, в 1941–1942 гг. проводились эксперименты над пациентами, больными шизофренией с целью изучения причины этого явления с помощью разработанного шейного устройства KRA-Cuff, которое при надувании могло перекрыть приток крови к мозгу. При прекращении кровотока до 100 секунд исследователи наблюдали последовательность реакций, включая потерю сознания, за которой следовали расширенные зрачки, тонические/клонические движения, потеря контроля над мочевым пузырем и, в итоге, опорожнение кишечника, а также появление патологических рефлексов [10].

В годы Второй мировой войны Теодор Ханнес Бензингер (Theodor Hannes Benzinger, 1905–1999), американский физиолог немецкого происхождения, проводил физиологические исследования (нередко с собственным участием) влияния быстрой декомпрессии и связанного с ней кислородного оборудования во время полетов на больших высотах. С 1934 по 1944 г. он возглавлял авиамедицинскую лабораторию «EMed» в Рехлине, где сыграл важную роль в проведении исследований, связанных с полетами в стратосфере и эксперименты с быстрой декомпрессией на высоте до 19 000 м. (часто с его личным участием). Эти эксперименты внесли существенный вклад в понимание физиологии человека и требований жизнеобеспечения в сфере высотной авиации, а позднее и для работ в условиях, эквивалентных космическим [11].

Американский физиолог Эрл Ховард Вуд (Earl Howard Wood, 1912–2009), исследовавший факторы потери сознания, вызванной ускорением, с которой сталкиваются пилоты высокопроизводительных самолетов, разработал приборы для измерения и регистрации артериального давления и содержания крови в тканях. Эти данные привели к разработке успешных мер противодействия потере сознания, вызванной ускорением, с помощью надувного «G-костюма» и маневра задержки дыхания «M1». После Второй мировой войны он использовал и модифицировал эти инструменты и использовал методы разведения индикатора путем непрерывного забора внутрисердечной крови, чтобы значительно повысить специфичность и чувствительность диагностики внутрисердечных анатомических и функциональных аномалий у пациентов с врожденными пороками сердца. Это способствовало значительному увеличению числа успешных операций на открытом сердце в 1950-е гг. [12].

Уже упоминавшийся У.Р. Лавлейс II вместе с военным летным хирургом Доном Дэвисом Фликингером (Don Davis Flickinger, 1907–1997) предположили, что с инженерной точки зрения было бы более практично отправлять в космос не мужчин, а женщин ввиду их меньшей массы тела и потребности в кислороде. В 1960 г. доктор Лавлейс взял на себя руководство программой «Женщина в космосе» и начал медицинские и физиологические испытания ряда опытных женщин-летчиков. Тесты, которым подверглись эти женщины, были идентичны тем, которые использовались для тестирования первых астронавтов программы «Меркурий», с добавлением гинекологических осмотров. 13 из 19 протестированных женщин сдали эти напряженные физиологические экзамены (для сравнения, среди протестированных мужчин сдали 18 из 32); часть этих пилотов была дополнительно протестирована на серии психологических экзаменов, которые были аналогичны или, в некоторых случаях, более требовательны, чем те, которые проводились для мужчин-кандидатов на «Меркурий». Несмотря на эти многообещающие результаты, дальнейшие испытания были остановлены [13].

В 1989 г. были рассмотрены 133 случая высотной ДКБ типа II (множественные системные симптомы, включая неврологические проявления), хранящиеся в файлах Школы аэрокосмической медицины ВВС США, большинство из которых (94,7 %) последовало за обучением в барокамере. Наиболее часто проявляемым симптомом было нарушение зрения. Были изучены 143 случая неврологической ДКБ типа II, также зарегистрированных в Школе аэрокосмической медицины ВВС США. Снова было выяснено, что наиболее распространенными неврологическими симптомами и признаками высокогорной ДКБ были визуальные изменения [2].

Отечественный специалист в области военной медицины Георгий Михайлович Зараковский (1925–2014) в 1965–1987 гг. возглавлял отдел психофизиологических исследований в Государственном научно-исследовательском испытательном институте авиационной и космической медицины. Качество решения задач, которые ставились перед летчиками, оценивались в зависимости от особенностей внимания, памяти и мышления, психического состояния и профессионально важных качеств человека оператора. Результаты теоретических и практических исследований по обеспечению профессиональной надежности летного состава, космонавтов и авиационных специалистов, проводимых Зараковским, легли в основу его докторской диссертации, защищенной в 1974 г. Он стал автором концепции управления психофизиологическим состоянием космонавтов в полете, разработал принципы, методы и способы поддержания их работоспособности и профилактики утомления [14].

С началом космических полетов перед исследователями встали новые вопросы. К ним относятся нейровестибулярные проблемы, включающие укачивание в пространстве и дезориентацию во время полета, а также нарушение баланса и нервно-мышечной координации после приземления; сердечно-сосудистые и жидкостные проблемы ортостатической гипотензии сразу после космического полета; изменение сердечной восприимчивости к желудочковым аритмиям; снижение массы сердечной мышцы и снижение сердечной

функции; проблемы атрофии мышц, включая потерю мышечной массы, силы и выносливости; снижение минеральной плотности костей; проблемы, связанные со сном, производительностью и циркадными ритмами; проблемы, связанные с ослаблением иммунитета.

Выводы и дальнейшие перспективы исследования

Таким образом, в развитии авиационной физиологии можно условно выделить два этапа. 1. Доавиационный, в рамках которого происходит зарождение этой области медико-биологических знаний. 2. Авиационный. На втором этапе у ученых появилась возможность исследовать множественные и разнонаправленные перегрузки и влияние их на организм человека.

Материалы настоящей статьи дополняют существующие историко-биологические исследования, посвященные развитию представлений об авиационной физиологии. Они могут быть использованы при дальнейшем исследовании становления и развития авиационной физиологии, а также как учебно-методический материал для изучения в рамках дисциплин «История биологии», «История медицины», «Физиология».

Библиографический список

1. Marotte H. L'exposition de l'Homme à l'altitude en aéronautique: de Paul Bert à nos jours [The exposure of man to altitude when flying: from Paul Bert to today] // *Journal of Social and Biological Systems*. 2006. V. 200. № 3. P. 251–255. doi: 10.1051/jbio:2006029. (in French).
2. Rodway G.W. Limb paralysis and visual changes during Glaisher and Coxwell's 1862 balloon ascent to over 8800 m. // *High Altitude Medicine & Biology*. 2007. V. 8. № 3. P. 256–259. doi: 10.1089/ham.2007.8311
3. Ушаков И.Б., Бухтияров И.В., Шипов А.А. Творческое развитие идей И.М. Сеченова в авиационной и космической медицине // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2011. Т. 97. № 7. С. 751–758.
4. Сорокина Т.С. Иван Михайлович Сеченов в истории российской и мировой физиологии // *Вестник Российского университета дружбы народов*. Серия: Медицина. 2014. № 3. С. 97–107.
5. Gunga H.C., Kirsch K.A. Nathan Zuntz (1847–1920) — a German pioneer in high altitude physiology and aviation medicine,

Part II: Scientific work // *Aviation Space and Environmental Medicine*. 1995. V. 66. № 2. P. 172–176.

6. Жданько И.М., Ворона А.А., Лапа В.В., Хоменко М.Н. Научно-исследовательскому испытательному центру авиационно-космической медицины и военной эргономики — 80 лет // *Военно-медицинский журнал*. 2015. Т. 336. № 3. С. 68–75.

7. Григорьев А.И., Баевский П.М., Галеева Н.Ю. Из научного наследия В.В. Парина (к разработке проблем космической медицины и физиологии) // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2003. Т. 37. № 2. С. 3–11.

8. Dietrichs E. Carl Wilhelm Sem-Jacobsen: Aerospace Neurophysiology and Deep Brain Stimulation Pioneer // *Neurology*. 2022. V. 98. № 5. P. 199–203. doi: 10.1212/WNL.0000000000013149.

9. Cooper M.G., Street N.E. High altitude hypoxia, a mask and a Street. Donation of an aviation BLB oxygen mask apparatus from World War 2 // *Anaesthesia, Pain and Intensive Care*. 2017. V. 45. № 7. P. 45–48. doi: 10.1177/0310057X170450S107

10. Smith B.A., Clayton E.W., Robertson D. Experimental arrest of cerebral blood flow in human subjects: the red wing studies revisited // *Perspectives in Biology and Medicine*. 2011. V. 54. № 2. P. 121–131. doi: 10.1353/pbm.2011.0018

11. Harsch V. Theodor Benzinger, German pioneer in high altitude physiology research and altitude protection // *Aviation Space and Environmental Medicine*. 2007. V. 78. № 9. P. 906–908.

12. Ritman E.L. Earl Wood — a research career noted for development of novel instruments driven by the power of the indicator dilution concept // *Journal of Applied Physiology*. 2014. V. 117. № 9. P. 945–956. doi: 10.1152/jappphysiol.00491.2014

13. Ryan K.L., Loeppky J.A., Kilgore D.E. Jr. A forgotten moment in physiology: the Lovelace Woman in Space Program (1960–1962) // *AJP Advances in Physiology Education*. 2009. V. 33. № 3. P. 157–164. doi: 10.1152/advan.00034.2009

14. Дворников М.В., Меденков А.А. Военно-морской и авиационный врач, психолог и физиолог (К 90-летию со дня рождения Г.М. Заракковского) // *Военно-медицинский журнал*. 2015. Т. 336. № 4. С. 81–83.

References

1. Marotte H. L'exposition de l'Homme à l'altitude en aéronautique: de Paul Bert à nos jours [The exposure of man to altitude when flying: from Paul Bert to today]. *Journal of Social and Biological Systems*. 2006;200(3):251–255. doi: 10.1051/jbio:2006029. (In French)
2. Rodway GW. Limb paralysis and visual changes during Glaisher and Coxwell's 1862 balloon ascent to over 8800 m. *High Altitude Medicine & Biology*. 2007;8(3):256–259. doi: 10.1089/ham.2007.8311
3. Ushakov IB, Bukhtiyarov IV, Shipov AA. I.M. Sechenov's creative development of ideas in aviation and space medicine. *Russian Journal of Physiology*. 2011;97(7):751–758. (In Russian).
4. Sorokina TS. Ivan Mikhaylovich Setchenov in the history of Russian and world physiology. *RUDN Journal of Medicine*. 2014;3:97–107. (In Russian).
5. Gunga HC, Kirsch KA. Nathan Zuntz (1847–1920)—a German pioneer in high altitude physiology and aviation medicine, Part II: Scientific work. *Aviation Space and Environmental Medicine*. 1995;66(2):172–176.

6. Zhdan'ko IM, Vorona AA, Lapa VV, Khomenko MN. Scientific and research experimentation center of aviation and space medicine and human engineering celebrates 80th anniversary. *Military Medical Journal*. 2015;336(3):68–75. (In Russian).
7. Grigor'ev AI, Baevskii RM, Galeeva NYu. From the scientific heritage of V.V. Parina (on the development of problems of space medicine and physiology). *Aerospace and Environmental Medicine*. 2003;37(2):3–11. (In Russian).
8. Dietrichs E. Carl Wilhelm Sem-Jacobsen: Aerospace Neurophysiology and Deep Brain Stimulation Pioneer. *Neurology*. 2022;98(5):199–203. doi: 10.1212/WNL.0000000000013149
9. Cooper MG, Street NE. High altitude hypoxia, a mask and a Street. Donation of an aviation BLB oxygen mask apparatus from World War 2. *Anaesthesia, Pain and Intensive Care*. 2017;45(7):45–48. doi: 10.1177/0310057X170450S107
10. Smith BA, Clayton EW, Robertson D. Experimental arrest of cerebral blood flow in human subjects: the red wing studies revisited. *Perspectives in Biology and Medicine*. 2011;54(2):121–131. doi: 10.1353/pbm.2011.0018
11. Harsch V. Theodor Benzinger, German pioneer in high altitude physiology research and altitude protection. *Aviation Space and Environmental Medicine*. 2007;78(9):906–908.
12. Ritman EL. Earl Wood — a research career noted for development of novel instruments driven by the power of the indicator dilution concept. *Journal of Applied Physiology*. 2014;117(9):945–956. doi: 10.1152/jappphysiol.00491.2014
13. Ryan KL, Loeppky JA, Kilgore DE Jr. A forgotten moment in physiology: the Lovelace Woman in Space Program (1960–1962). *AJP Advances in Physiology Education*. 2009;33(3):157–164. doi: 10.1152/advan.00034.2009
14. Dvornikov MV, Medenkov AA. Marine, aviation and space physician, psychologist and physiologist (to the 90th anniversary of the birth of G.M. Zarakovskii). *Military Medical Journal*. 2015;336(4):81–83. (In Russian).

Ответственный за переписку: Суботьялов Михаил Альбертович — доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет»; доцент кафедры фундаментальной медицины, ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Российская Федерация, 630055, г. Новосибирск, ул. Иванова, 8. E-mail: subotyalov@yandex.ru

Гребенников Е.К. SPIN 5283–5396; ORCID 0009–0000–5495–7922
Гребенникова И.Н. SPIN 7369–2925; ORCID 0009–0002–7466–3651
Суботьялова А.М. SPIN 8681–6985; ORCID 0000–0001–8235–4395
Суботьялов М.А. SPIN 9170–4604; ORCID 0000–0001–8633–1254

Corresponding author: Mikhail A. Subotyalov, PhD, MD, DSc, Associate Professor, Novosibirsk State Pedagogical University, Department of Anatomy, Physiology and Life safety; Professor of the Fundamental Medicine Department, Novosibirsk State University, 630055, Ivanova str., 8, Novosibirsk, Russian Federation, E-mail: subotyalov@yandex.ru

Grebennikov E.K. ORCID 0009–0000–5495–7922
Grebennikova I.N. ORCID 0009–0002–7466–3651
Subotyalova A.M. ORCID 0000–0001–8235–4395
Subotyalov M.A. ORCID 0000–0001–8633–1254



DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-419-427
EDN: CZEBQX

ORIGINAL RESEARCH
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Blood pressure status in patients with metabolic syndrome

Jitender Sorout , Sudhanshu Kacker , Neha Saboo ✉, Munesh Kumar 

Rajasthan University of Health Sciences College of Medical Sciences, Jaipur, Rajasthan, India

✉ nehasaboo8@gmail.com

Abstract. *Relevance.* Metabolic syndrome (MetS) is existence of many abnormalities, such as abdominal obesity, hypertension, dyslipidemia, and glucose intolerance. The occurrence of MetS in hypertensive people is linked to poorly managed hypertension. One of the parameters for the diagnosis of the syndrome is the presence of increased blood pressure; nevertheless, research shows that MetS patients are likely to experience hypertension often. *Materials and Methods.* 300 metabolic subjects were selected from the medicine OPD as study participants based on the joint interim statement's 2009 definition of the metabolic syndrome. They were divided into three groups (normotensive, pre-hypertensive, and hypertensive) based on blood pressure readings that met the American Heart Association's (AHA) Asian blood pressure criteria. The following parameters were recorded for data collection: anthropometric (Weight, Height, Body Mass Index Waist Hip Ratio), Blood pressure, biochemical (Fasting blood glucose, Lipid profile parameters). *Results and Discussion.* According to the resting blood pressure readings, out of 300 metabolic syndrome participants, 37 were normotensive [male (40.54 %); female (59.45 %)], 115 were pre-hypertensive [male (58.26 %); female (41.74 %)], and 148 were hypertensive [male (52.7 %); female (47.3 %)]. In several parameters, there was no such significant difference between male and female participants across all groups. However, the levels of blood total cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein were considerably greater in hypertensive and pre-hypertensive metabolic participants than in normotensive subjects, while the levels of high-density lipoprotein were lower. *Conclusion.* Study findings suggest, hypertension and pre-hypertension were more prevalent in the group with metabolic syndrome. Additionally, hypertensives have a higher chance of manifesting dyslipidemia.

Keywords: blood pressure, hypertension, metabolic syndrome, pre-hypertension, risk factors

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship and publication of this article.

Author contributions. Sorout J. — research concept, data collection, manuscript preparation; Kacker S. — Analysis of data obtained, critical analysis; Saboo N. — entry of the data obtained, Analysis of data obtained; Kumar M.- text writing. Each author contributed personally to the interpretation of the data and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

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

© Sorout J., Kacker S., Saboo N., Kumar M., 2023



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

Acknowledgement. We really appreciate the cooperation of each and every participant. We also want to express our gratitude to the medical team and technical employees of the government-run RDBP Jaipuria Hospital, associated with RUHS College of Medical Sciences in Jaipur, Rajasthan.

Ethics approval. Prior to starting the study RUHS College of Medical Jaipur institutional ethical committee clearance was taken.

Consent for publication: Written consent was obtained from the patients for the investigation and publication of relevant medical information according to WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013.

Received 16.09.2023. Accepted 12.10.2023.

For citation: Sorout J, Kacker S, Saboo N, Kumar M. Blood pressure status in patients with metabolic syndrome. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):419–427. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–419–427

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a cluster of several disorders, which together raise the risk of an individual developing atherosclerotic cardiovascular disease, insulin resistance, and diabetes mellitus, and vascular and neurological complications such as a cerebrovascular accident. MetS is a much larger problem among south Asian populations, including India, has incited plenty of interest over the past 3 decades [1]. There is an escalating age-related prevalence in both men and women [2]. In an international study which had estimated that approximately 13–15 % of the adult population in India is having MetS, with females being more affected (approximately 8–9 % among adult males and 18–19 % among adult females) [3]. Metabolic syndrome (MetS) is characterized by the simultaneous presence of specific abnormalities, including abdominal obesity, hypertension, dyslipidemia and glucose intolerance, leading to increased risk for cardiovascular events. Person having metabolic syndrome had to have three or more of the following cardiometabolic risk factors to meet the diagnosis of MetS as defined by joint interim statement, 2009 [4]:

- I. Waist circumference more than 40 inches in men and 35 inches in women.
- II. Elevated triglycerides 150 milligrams per deciliter of blood (mg/dL) or greater.
- III. Reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDL) less than 40 mg/dL in men or less than 50 mg/dL in women.

- IV. Elevated fasting glucose of 100 mg/dL or greater.
- V. Blood pressure values of systolic 130 mmHg or higher and/or diastolic 85 mmHg or higher.

Metabolic syndrome is associated with development of cardiovascular disease. It is associated with four-fold increase in risk of fatal coronary heart disease and two-fold greater risk of cardiovascular disease and all causes of mortality among men; even after adjusting for age, LDL-C, diabetes, smoking and family history of coronary heart disease (CHD). It is also an important predictor of type 2 diabetes. Patients with MS have 5 to 9-fold increase risk of developing type 2 diabetes [5]. In hypertensive individuals, the presence of MetS is associated with poorly controlled hypertension [6]. The presence of elevated blood pressure is one of the required criteria for the diagnosis of the syndrome, while evidence suggests that hypertension is encountered very often in people with MetS [7]. Insulin resistance activates the sympathetic nervous system, upregulates angiotensin II receptors and reduces the synthesis of nitric oxide, leading to increases in heart rate and blood pressure [8, 9].

Materials and Methods

Design of the study

The present observational study was conducted in the Physiology Department of the RUHS College of Medical Sciences and associated hospital, Jaipur. The RUHS College of Medical Sciences, Jaipur, institutional

ethics committee granted the study its ethical approval. The study's estimated sample size was 282, with a margin of error of $\pm 10\%$, a sample percentage of 50%, and a confidence level of 95%. The sample size of the study was 300 individuals due to dropouts or non-responding subjects [10]. After analyzing the inclusion and exclusion criteria, all subjects were recruited from the RDBP Jaipuria hospital's medicine OPD, and a written informed consent was acquired from each participant.

In accordance with the Joint Interim Statement from 2009, subjects were diagnosed with metabolic syndrome if they exhibited three or more of the following cardio-metabolic risk factors [1].

- (1) Waist circumference more than 40 inches in men and 35 inches in women.
- (2) Triglycerides (TG) $>150\text{mg/dL}$.
- (3) Reduced HDL-C $<40\text{mg/dL}$ in males; $<50\text{mg/dL}$ in females.
- (4) Elevated systolic blood pressure (SBP) >130 and/or diastolic blood pressure (DBP) $>85\text{mmHg}$.
- (5) Elevated fasting plasma glucose (FPG) $>100\text{mg/dL}$ between 18–60 years age group of either sex.

The study excluded patients with cardiac conditions (myocardial ischemia, cardiomyopathy, and atherosclerosis), respiratory, musculoskeletal, and renal problems, as well as pregnant and lactating women. Additionally, those with significant impairments including kyphosis, scoliosis, and osteoarthritis were also disqualified, as were those with a recent history of hospitalization within the past three months.

In accordance with the NHANES recommendations, the height (cm) and weight (kg) were measured using stadiometers and calibrated weighing scales, respectively [11]. The formula $\text{weight (kg)}/\text{height (m)}^2$ was used to determine BMI. Using a linen measuring tape, the circumferences of the waist and hips were measured while the subjects were standing with their heels together, at the level of the umbilicus and the maximal protrusion of the hip, respectively [11]. Following a 15–30 minute period of sitting still, the Sphygmomanometer will be used to measure both SBP and DBP [12]. All research subjects had their biochemical data (fasting blood glucose, total

cholesterol, LDL, VLDL, triglyceride, and HDL cholesterol levels) gathered [13–15]. For the biochemical testing, they were instructed to arrive after an overnight fast of 8 to 10 hours. We separated these individuals into three groups (normal, pre-hypertensive, and hypertensive) based on their blood pressure (mmHg) readings and the criteria established by the American Heart Association (AHA) for Asians [16].

Statistical analysis

Microsoft Excel was used to organize the collected data. For data that was normally distributed, mean \pm SD was computed. Using SPSS software, an unpaired student t-test was used to determine the level of statistical significance. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results and Discussion

We grouped 300 metabolic syndrome subjects into normotensive (37) [male (40.54%); female (59.45%)], pre-hypertensive (115) [male (58.26%); female (41.74%)], hypertensive (148) [male (52.7%); female (47.3%)] according to their resting blood pressure values (Fig. 1).

Figure 2 depicts the distribution of total metabolic syndrome population on the basis of their inclusion criteria for metabolic syndrome. There were 95.71% females had waist circumference more 35 inches and 31.25% males had waist circumference more than 35 inches. There were 77.86% females had triglyceride level equal to or more than 150 mg/dl and 76.87% males had triglyceride level equal to or more than 150 mg/dl. There were 84.28% females had HDL level less than 50 mg/dl and 60% males had HDL level less than 40 mg/dl. There were 77.86% females had fasting blood glucose (FBG) level equal to and more than 100 mg/dl and 71.25% males had fasting blood glucose (FBG) level equal to and more than 100 mg/dl. There were 72.86% females had systolic blood pressure equal to and more than 130 mmHg and/or diastolic blood pressure equal to and more than 85 mmHg. But 81.25% females had systolic blood pressure equal to and more than 130 mmHg and/or diastolic blood pressure equal to and more than 85 mmHg.

Percentage distribution

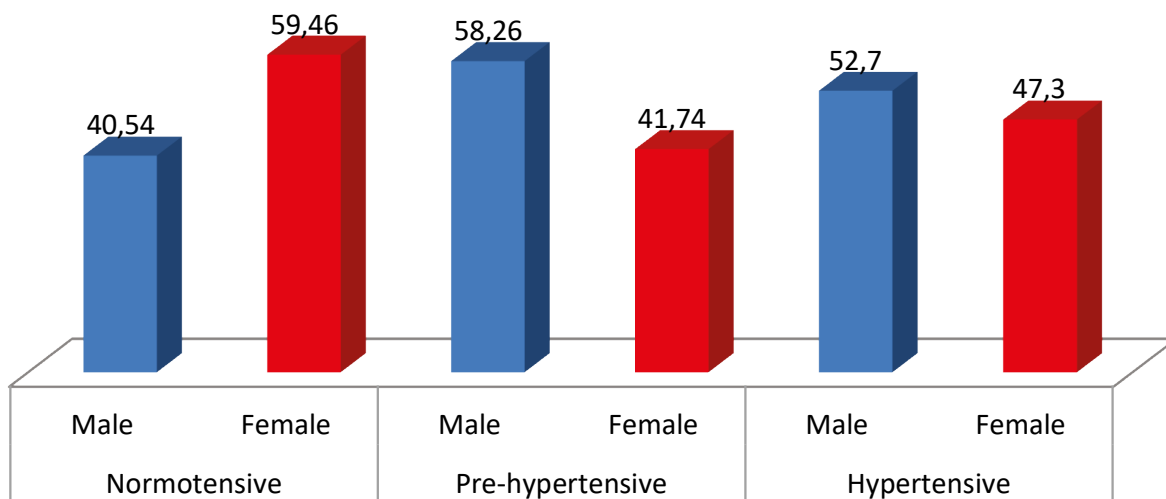


Fig. 1. Distribution of male and female subjects in different groups

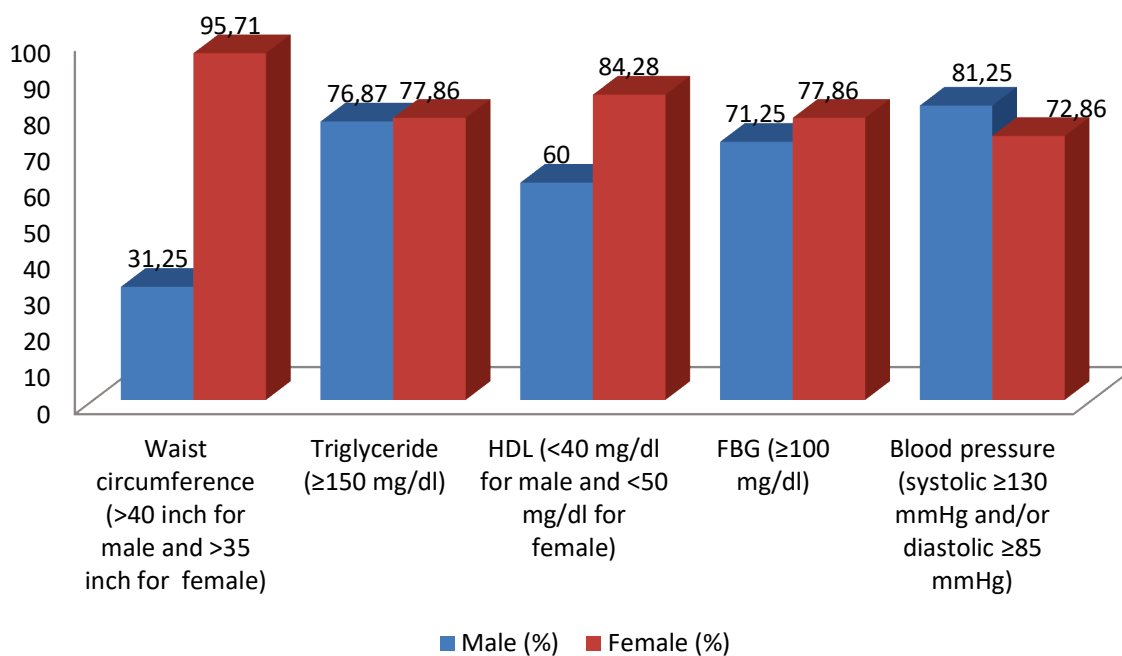


Fig. 2. Distribution of subjects on the basis of their inclusion criteria for metabolic syndrome

Table 1 depicts mean \pm SD distribution of various parameters in normotensive male and female subjects. Significant difference was seen in mean values of height,

waist- hip ratio of male and female normotensive metabolic subjects.

Table 1

Distribution of Anthropometric and Biochemical Parameters of Normotensive Group

Parameters	Male (N = 15)	Female(N = 22)	P value
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Age	35.57 \pm 10.23	39.09 \pm 11.22	0.279
Weight	77.33 \pm 12.27	70.23 \pm 9.8	0.058
Height	1.66 \pm 0.07	1.56 \pm 0.06	0.000
BMI	28.2 \pm 4.21	28.83 \pm 4.06	0.648
Waist	39.34 \pm 3.76	40.37 \pm 2.97	0.360
Hip	38.76 \pm 4.37	41.48 \pm 4.36	0.071
WHR	1.01 \pm 0.06	0.98 \pm 0.05	0.031
SBP	115.07 \pm 5	114.45 \pm 6.70	0.710
DBP	78.80 \pm 5.49	76.45 \pm 5.89	0.230
FBG	129 \pm 45.29	135.43 \pm 54.97	0.071
Total Cholesterol	234.47 \pm 71.06	199.05 \pm 35.55	0.190
HDL	43.62 \pm 15.36	38.30 \pm 13.24	0.268
LDL	124.19 \pm 34.84	122.47 \pm 34.09	0.882
VLDL	35.22 \pm 12.95	41.19 \pm 15.19	0.221
TG	177.29 \pm 30.57	179.01 \pm 42.97	0.895

Note: BMI – Body Mass Index; WHR – Waist Hip Ratio; SBP- Systolic Blood Pressure; DBP – Diastolic Blood Pressure; HDL – High Density Lipoprotein; LDL–Low Density Lipoprotein; VLDL–Very Low-Density Lipoprotein; Significant, $p < 0.05$.

Table 2 depicts mean \pm SD distribution of various parameters in pre-hypertensive male and female subjects. Significant difference was seen in mean values

of age, weight, height, BMI, waist-hip circumference, and HDL of male and female pre-hypertensivemetabolic subjects.

Table 2

Distribution of Anthropometric and Biochemical Parameters Pre-hypertensive Group

Parameters	Male (N = 67)	Female(N = 48)	P value
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Age	36.4 \pm 10.58	45.75 \pm 10.11	0.000
Weight	75.84 \pm 10.08	70.13 \pm 11.65	0.006
Height	1.67 \pm 0.80	1.54 \pm 0.08	0.000
BMI	27.2 \pm 3.57	29.50 \pm 4.67	0.003
Waist	38.96 \pm 8.77	45.88 \pm 17.94	0.007
Hip	39.14 \pm 8.45	45.92 \pm 9.05	0.015
WHR	1 \pm 0.06	1.008 \pm 0.053	0.296
SBP	132.6 \pm 4.95	132.17 \pm 4.75	0.641
DBP	86.18 \pm 4.99	86.96 \pm 5.17	0.418
FBG	114.78 \pm 35.85	123.04 \pm 31.2	0.201
Total Cholesterol	193.15 \pm 39.59	205.32 \pm 41.12	0.193

End of the table 2

Parameters	Male (N = 67)	Female(N = 48)	P value
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
HDL	39.73 \pm 10.7	44.34 \pm 12.37	0.035
LDL	113.3 \pm 34.62	117.26 \pm 33.77	0.542
VLDL	36.11 \pm 16.3	35.88 \pm 14.84	0.940
TG	168.52 \pm 52.33	160.5 \pm 40.32	0.376

Table 3 depicts mean \pm SD distribution of various parameters in hypertensive male and female subjects. There was significant difference of mean values of weight, height, BMI, and waist- hip circumference

of male and female hypertensive metabolic subjects. However, both male and female participants in this study had higher anthropometric and biochemical markers.

Table 3

Distribution of Anthropometric and Biochemical Parameters of Hypertensive Group

Parameters	Male (N = 78)	Female(N = 70)	P value
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Age	45.36 \pm 10.87	47.37 \pm 11	0.265
Weight	77 \pm 12.27	70.7 \pm 12.86	0.003
Height	1.68 \pm 0.07	1.56 \pm 0.07	0.000
BMI	27.24 \pm 3.96	29.1 \pm 5.62	0.021
Waist	40.72 \pm 11.08	45.93 \pm 16.49	0.024
Hip	41.03 \pm 10.51	46.27 \pm 17.24	0.025
WHR	0.99 \pm 0.06	1 \pm 0.053	0.593
SBP	155.72 \pm 18.39	154.66 \pm 17.34	0.719
DBP	96.9 \pm 13.12	94.6 \pm 6.8	0.191
FBG	145.73 \pm 55.79	143.14 \pm 52.64	0.773
Total Cholesterol	207.85 \pm 37.27	206.9 \pm 39.07	0.899
HDL	39.34 \pm 11.95	39.34 \pm 11.62	0.999
LDL	122.87 \pm 29.91	121.53 \pm 32.28	0.793
VLDL	40.02 \pm 18.74	38.95 \pm 14.35	0.699
TG	181.33 \pm 62.52	168.38 \pm 43.57	0.150

In this observational study, we evaluated patients for metabolic syndrome who attended Government RDBP Jaipuria Hospital in Jaipur's Medicine department's outdoor patient's department (OPD). These people were divided into three groups: normotensive (37) [male (40.54 %); female (59.45 %)], pre-hypertensive (115) [male (58.26 %); female (41.74 %)], hypertensive (148) [male

(52.7 %); female (47.3 %)] (figure 1). Based on the criteria established by the American Heart Association (AHA) for Asians [16].The emergence of cardiovascular disease is linked to metabolic syndrome. There is a two-fold increase in the risk of cardiovascular disease and a four-fold increase in the risk of fatal coronary heart disease. In India and other South Asian nations, the prevalence of obesity and

metabolic syndrome is rising rapidly, increasing mortality and morbidity from CVD and T2DM [17, 18]. In the current study, there were no such significant differences between male and female participants across all groups in several parameters. According to the findings of our study, metabolic hypertensive patients were aged than pre-hypertensive and normotensive patients. The mortality rate attributable to the metabolic syndrome and its risk factors differ by gender and age. Our findings show that the prevalence of MetS rises with age and is more common in men than in women. Multiple studies have also shown that «modernization» causes the change in physical activity levels, adiposity, dietary, and psychosocial stress, which raise blood pressure and exacerbate age-related elevations in blood pressure. The waist-hip ratio and body mass index were nearly same across all BP groups. According to the acceptable body mass index provided by the WHO for Asian populations, body mass index indicates that all participants were obese [19]. And WHR was also more than cut-off points for Asians used (0.95 in men and 0.80 in women) [20]. In our study, the hypertension and prehypertensive groups had higher fasting blood glucose levels than the normotensive group. FBG was shown to be positively associated with BP, according to Lu Y et al. In males and females, BP and FBG had different associations [21]. The renin — angiotensin aldosterone system (RAAS), which affects blood pressure, may be altered if the FBG level rises as a result of metabolic diseases, obesity, and hyperglycemia with insulin resistance [22]. In the current study, all groups had raised levels of total cholesterol, LDL, VLDL, and TG, although hypertensive and pre-hypertensive had greater levels than normotensive. This exceeded the criteria for cholesterol targets for South Asians provided by the ATP III study from the National Cholesterol Education Program in the United States [23]. However, in the current investigation, metabolic individuals with hypertension and pre-hypertension had low HDL levels. The findings of the Choudhury KN et al. research support our findings that hypertension individuals had considerably higher mean serum TC, TG, and LDL levels than normotensive patients [24]. Additionally, the mean HDL level was statistically significantly lower in hypertensives compared to normotensives. Because insulin influences TG and HDL–C metabolism, the occurrence

of hypertriglyceridemia and low HDL concentrations generally never occurred as independent illnesses and were almost usually associated to insulin resistance [25]. In this present study hypertension and pre-hypertension were more prevalent in the population with metabolic syndrome.

Limitations

Large-scale prospective studies might demonstrate a significant association between the prevalence of hypertension and the risk of metabolic syndrome in both genders.

Conclusion

The above study's findings suggest that hypertension and pre-hypertension were more prevalent in the population with metabolic syndrome. Additionally, hypertensives have a higher chance than pre-hypertensive and normotensive individuals of manifesting dyslipidemia, which includes raised TC, LDL, and TG values as well as decreased HDL cholesterol. But as they become older, these normotensive and pre-hypertensive individuals become more likely to develop hypertension. Findings of this study indicate that more than one metabolic risk factor is responsible metabolic syndrome, it is cumulative. Findings of this study sought that knowledge of factors involved will be helpful for making treatment plan.

References / Библиографический список

1. Mohanan PP. Metabolic syndrome in Indian population: public health implication. *Hypertens J*. 2016;2:1–6.
2. Deedwania PC, Gupta R. Management issues in the metabolic syndrome. *J Assoc Physicians India*. 2006; 54: 797–810.
3. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415–28. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7
4. van der Pal KC, Koopman ADM, Lakerveld J, van der Heijden AA, Elders PJ, Beulens JW, Rutters F. The association between multiple sleep-related characteristics and the metabolic syndrome in the general population: the New Hoorn study. *Sleep Med*. 2018;52:51–57. doi: 10.1016/j.sleep.2018.07.022
5. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education

Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertens.* 2003;42(6):1206–52. doi: 10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2

6. Arcucci O, de Simone G, Izzo R, Rozza F, Chinali M, Rao MA, Bodenizza C, De Luca N, Trimarco B. Association of suboptimal blood pressure control with body size and metabolic abnormalities. *J Hypertens.* 2007;25(11):2296–300. doi: 10.1097/HJH.0b013e3282e9a9e4

7. Chimonas T, Karagiannis A, Athyros VG, Achimastos A, Elisaf M, Panagiotakos DB. Assessing The Treatment Effect in Metabolic Syndrome without Perceptible diabeTes (ATTEMPT) Collaborative Group. Blood pressure levels constitute the most important determinant of the metabolic syndrome in a Mediterranean population: a discrimination analysis. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(6):523–9. doi: 10.1089/met.2010.0023

8. Mancía G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, Julius S, Reid J, Van Zwieten PA. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens.* 2007;25(5):909–20. doi: 10.1097/HJH.0b013e328048d004

9. Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: Prevalence, pathogenesis and management. *NutrMetab Cardiovasc Dis.* 2010;20:140–46. doi: 10.1016/j.numecd.2009.08.006

10. Yadav R, Yadav RK, Khadgawat R, Pandey RM, Upadhyay AD, Mehta N. Randomized Controlled Trial of A 12-Week Yoga-Based (Including Diet) Lifestyle vs. Dietary Intervention on Cardio-Metabolic Risk Factors and Continuous Risk Score in Indian Adults with Metabolic Syndrome. *Behav Med.* 2020;46(1):9–20. doi: 10.1080/08964289.2018.1538098

11. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)-Anthropometry Procedures Manual, January 2007. https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/20152016/manuals/2016_Anthropometry_Procedures_Manual.pdf. [Accessed on 13 June 2023]

12. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* 2004;114(2 Suppl 4th Report):555–76.

13. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.* 1969;22(2):158–61. doi: 10.1136/jcp.22.2.158

14. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974;20(4):470–5

15. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982;28(10):2077–80.

16. Huang Y, Cai X, Liu C, Zhu D, Hua J, Hu Y, Peng J, Xu D. Prehypertension and the risk of coronary heart disease in Asian and Western populations: a meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(2):e001519. doi: 10.1161/JAHA.114.001519

17. Mohan V, Rao GHR. Type 2 Diabetes in South Asains. 1st ed. New Delhi: South Asian Society on Atherosclerosis and Thrombosis. 2007. New Delhi. India. 435 p.

18. Misra A, Khurana L. The metabolic syndrome in South Asians: epidemiology, determinants, and prevention. *Metab Syndr Relat Disord.* 2009;7(6):497–514. doi: 10.1089/met.2009.0024

19. WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet.* 2004;363(9403):157–63. doi: 10.1016/S0140-6736(03)15268-3

20. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ.* 1995;311(6998):158–61. doi: 10.1136/bmj.311.6998.158

21. Lv Y, Yao Y, Ye J. Association of Blood Pressure with Fasting Blood Glucose Levels in Northeast China: A Cross-Sectional Study. *Sci Rep.* 2018; (8):7917. doi: 10.1038/s41598-018-26323-6

22. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(3):144–53. doi: 10.1038/nrendo.2015.216

23. NIH ATP 3 Guidelines and overview of antilipid medications: <http://www.nhlbi.nih.gov/health-pro/guidelines/current/cholesterol-guidelines/quick-desk-reference.html> [Accessed on 13 June 2023].

24. Choudhury KN, Mainuddin AK, Wahiduzzaman M, Islam SM. Serum lipid profile and its association with hypertension in Bangladesh. *Vasc Health Risk Manag.* 2014;10:327–32. doi: 10.2147/VHRM.S61019

25. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes.* 1993;42(6):833–42. doi: 10.2337/diab.42.6.833

Состояние артериального давления у пациентов с метаболическим синдромом

Д. Сороут^{ID}, С. Какер^{ID}, Н. Сабу^{ID}✉, М. Кумар^{ID}

Колледж медицинских наук Раджастанского университета медицинских наук, г. Джайпур, Раджастан, Индия
✉ nehasaboo8@gmail.com

Аннотация. *Актуальность.* Метаболический синдром (МетС) — это наличие множества отклонений, таких как абдоминальное ожирение, гипертония, дислипидемия и непереносимость глюкозы. Возникновение МетС у людей с гипертонической болезнью связано с плохо управляемой гипертонией. Одним из параметров диагностики синдрома является наличие повышенного артериального давления; тем не менее, исследования показывают, что пациенты с МетС часто страдают гипертонией. *Материалы и методы.* 300 субъектов, страдающих обменом веществ, были выбраны из медицинского OPD в качестве участников исследования на основе определения МетС, содержащегося в совместном промежуточном заявлении 2009 г. Они были разделены на три группы (нормотензивные, предгипертензивные и гипертонические) на основании показаний

артериального давления, соответствующих азиатским критериям артериального давления Американской кардиологической ассоциации (АНА). Для сбора данных записывались следующие параметры: антропометрические (вес, рост, индекс массы тела, соотношение талии и бедер), кровяное давление, биохимические (глюкоза в крови натощак, параметры липидного профиля). *Результаты и обсуждение.* Согласно показаниям артериального давления в покое, из 300 участников MetS 37 имели нормотензивное давление [мужчины (40,54 %); женщины (59,45 %)], 115 были в предгипертензивном состоянии [мужчины (58,26 %); женщины (41,74 %)], 148 человек страдали гипертонической болезнью [мужчины (52,7 %); женщины (47,3 %)]. По нескольким параметрам не было столь существенной разницы между участниками мужского и женского пола во всех группах. Однако уровни общего холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности в крови были значительно выше у гипертонических и предгипертонических участников метаболического процесса, чем у нормотензивных субъектов, тогда как уровни липопротеинов высокой плотности были ниже. *Выводы.* Результаты исследования показывают, что гипертония и предгипертония более распространены в группе с метаболическим синдромом. Кроме того, у гипертоников выше вероятность проявления дислипидемии.

Ключевые слова: артериальное давление, артериальная гипертензия, метаболический синдром, гипертония, факторы риска

Информация о финансировании. Авторы не получали финансовой поддержки для исследования и публикации данной статьи.

Вклад автора. Сорут Дж. — концепция исследования, сбор данных, подготовка рукописи; Какер С. — Анализ полученных данных, критический анализ; Сабу Н. — ввод полученных данных, Анализ полученных данных; Кумар М. — написание текста. Каждый автор лично участвовал в интерпретации данных и написании рукописи. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Этическое утверждение. Перед началом исследования было получено разрешение Этического комитета Медицинского колледжа RUHS в Джайпуре, Раджастхан, Индия.

Благодарности. Мы очень ценим сотрудничество каждого участника. Мы также хотим выразить благодарность медицинской команде и техническим сотрудникам государственной больницы RDBP Jaipuria, связанной с Колледжем медицинских наук RUHS в Джайпуре, Раджастхан, Индия.

Этическое утверждение. Перед началом исследования было получено разрешение этического комитета Медицинского колледжа RUHS в Джайпуре, Индия

Информированное согласие на публикацию. От пациентов было получено письменное согласие на исследование и публикацию соответствующей медицинской информации в соответствии с Хельсинкской декларацией WMA — Этические принципы медицинских исследований с участием людей, 2013 г.

Поступила 16.09.2023. Принята 12.10.2023.

Для цитирования: Sorout J., Kacker S., Saboo N., Kumar M. Blood pressure status in patients with metabolic syndrome // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 1. С. 419–427. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-419-427

Corresponding author: Neha Saboo — MD, Ph. D., Associate Professor, Department of Physiology, Rajasthan University of Health Sciences College of Medical Sciences, 302033, Pratap nagar, Jaipur, Rajasthan, India. E-mail: nehasaboo8@gmail.com
Sorout J. ORCID 0000-0002-1510-0982
Kacker S. ORCID 0000-0001-8947-2036
Saboo N. ORCID 0000-0002-3874-1459
Kumar M. ORCID 0009-0003-2499-6500

Ответственный за переписку: Неха Сабу — доктор медицинских наук, доцент кафедры физиологии Колледжа медицинских наук Раджастанского университета медицинских наук, Индия, 302033, Раджастан, Джайпур, Праатапнагар. E-mail: nehasaboo8@gmail.com
Сорут Дж. ORCID 0000-0002-1510-0982
Какер С. ORCID 0000-0001-8947-2036
Сабу Н. ORCID 0000-0002-3874-1459
Кумар М. ORCID 0009-0003-2499-6500



DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-428-440


EDN: JUJSDO

ORIGINAL RESEARCH
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Monitoring of Neuromuscular block during emergency abdominal surgery

Neelam Dhunpath  , Marina V. Petrova , Victor V. Moroz ,
Andrey V. Butrov , Marat A. Magomedov 

RUDN University, Moscow, Russian Federation

 dhunpathneelam@gmail.com

Abstract. Relevance. Sixty percent of cases of residual neuromuscular block (rNMB) were recorded globally, yet this issue of rNMB in critically ill patients remains taboo. To predict any leftover NMB, a train-of-four stimulation (TOF) Watch SX was utilized to track the depth of muscle relaxant in emergency patients both during and after surgery, even when they were transported to the intensive care unit. *This study aimed* to investigate differences in the variability of neuromuscular block between two distinct surgical procedures: laparoscopic cholecystectomy (the control group) and emergency abdominal surgery (the investigation group). *Materials and Methods.* Using two different muscle relaxants and assessing their depth using accelerometry notably the TOF Watch SX. A total of 140 patients, aged 18–60 years with a BMI of 18–30 kg/m², participated in the study. Group I underwent planned cholecystectomy (control group), while Group II underwent emergency abdominal surgery (investigation group). The muscle relaxants Ridelat-C, generic of atracurium benzilate (Verofarm OOO, Harabovsk, Russia) and Kruaron, generic of rocuronium bromide (Verofarm OOO, Harabovsk, Russia) were administered, with various monitoring methods, including Drager Fabius, ECG, and lab results, Microsoft Office Professional Plus 2021 advanced with graphs and ANOVA. *Results and Discussion.* The results demonstrated profound skeletal muscle relaxation for planned cholecystectomy, with TOF 0 achieved at 165.9 ± 95 seconds for Kruaron and 183.3 ± 90 seconds for Ridelat-C. In emergency abdominal surgery, it took 207.1 ± 120 seconds with Kruaron and 255.5 ± 109.5 seconds with Ridelat-C at TOF0. Notably, Kruaron exhibited prolonged effects in Group II, leading to residual neuromuscular block in critically ill even 2.5 hours post-surgery. *Conclusion.* Neuromuscular blocking agents modestly exacerbated neuromuscular dysfunction, potentially contributing to acquired critical illness polyneuropathy/myopathy, severe sepsis/septic shock, and massive blood loss/haemorrhagic shock. In critically ill, a minimal calculated dose of Kruaron is recommended, while Ridelat-C, which metabolized within the blood plasma without involving the kidneys or liver, might be a better choice. Suggamadex was suggested for reversing Kruaron effects due to its rapid effect as compared to proserine.

© Dhunpath N., Petrova M.V., Moroz V.V., Butrov A.V., Magomedov M.A., 2023

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

Keywords: neuro muscular block monitoring, planned cholecystectomy, emergency abdominal surgery, Kruaron, Ridelat-C, Residual NMB

Funding. The research was supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Author contributions. Dhunpath N. — research concept, data collection; Dhunpath N. — Analysis of data obtained; Dhunpath N., Petrova M, Butrov A. — entry of the data obtained, Analysis of data obtained; Dhunpath N., Moroz V., Dhunpath N., Magomedov M — text writing. Each author contributed personally to the interpretation of the data and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

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

Acknowledgements — Sincere thanks to all participants and technical staff for their support.

Ethics approval. The study was approved by the Ethics Committee of RUDN University.

Consent for publication. Written voluntary consent was obtained from the patients for the investigation and publication of relevant medical information according to WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013.

Received 16.10.2023. Accepted 14.11.2023.

For citation: Dhunpath N., Petrova M.V., Moroz V.V., Butrov A.V., Magomedov M.A. Monitoring of Neuromuscular block during emergency abdominal surgery. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):428–440. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–428–440

Introduction

Neuromuscular block anesthetics NMBA by definition are anesthetic drugs causing skeletal muscle paralysis initially by making a decrease response to acetylcholine at the neuro-muscular junction of skeletal muscle [1]. During surgery NMBA enhance endotracheal intubation by protecting patients from vocal cord injury thus improving the task of the surgeons by stopping involuntary reflex skeletal muscle movements [2]. Neuromuscular block in a sense after a surgery can be rapidly and effectively stopped. Seemingly, it was being identified that NMBAs proceed to act further in the post anesthesia care unit despite the administration of acetyl cholinesterase inhibitor. Residual neuro-muscular block is characterized by a bunch of muscle weakness in the post-operative period after NMBAs which is a matter of concern [3] Also, in critically ill patients, residual NMB is presently a very alarming problem in PACU unfortunately 60 % of the world's patients undergoing massive open abdominal emergency surgery have been reported with residual neuromuscular block [4–7] Many cases of residual neuromuscular block had

been reported without the use of antidotes notably: «Proserine or Sugammadex» for their reversal [8]. For the betterment of the patient's health and to lose less time in operation theatre the proper monitoring of NMB using a train-of-four stimulation (TOF) Watch SX is a plus [9]. Massive blood loss, hypovolemia, severe sepsis, peritonitis, pancreatic necrosis, dysfunction of liver or kidneys are the underlying pathologies affecting the time of action, duration, excretion and the speed of recovery of muscle relaxants in emergency patients.

Material and Methods

140 patients undergoing planned laparoscopic cholecystectomy and emergency abdominal surgeries notably (laparotomy appendectomy, resection of a part of the intestines, relaparotomy, lavage and drainage of the abdominal cavity, pancreatectomy, endoscopic suturing of internal GIT bleeding organs, laparoscopic pyloroplasty) whereby TOF watch SX Organon (Dublin Ireland Serial no.14–2007058) was used for monitoring the depth of muscle relaxant.

Kruaron the generic of rocuronium bromide (Verofarm OOO, Harabovsk, Russia) and Ridelat-C the generic of atracurium benzilate (Sotex, Deco company, Moscow, Russia) were intravenously administered. Proserine was also used as antidote together with the mechanical ventilation apparatus-Drager Fabius. Written voluntary consent was obtained from the patients for the investigation and publication of relevant medical information according to WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013.

Inclusion Criteria:

- adult male and female patients aged 18 to 60;
- planned for a patient surgical intervention of medium duration (60–90mins);
- the severity of the condition before surgery according to the ASA classification (American Society of Anesthesiologists) — ASA Class I–IV;
- patients with body mass index $18 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$; Patients who have agreed to participate in the study, have read the patient information sheet and signed the informed consent of the Patient, and are willing to cooperate in the course of the study;
- patients who are scheduled to undergo surgery using total intravenous anesthesia or combined endotracheal anesthesia (propofol, fentanyl, midazolam, etc.) with an estimated duration of surgery of 30–120 minutes.

Exclusion Criteria:

- patients with significant disorders of neuro-muscular conduction, neuromuscular diseases (including myasthenia gravis, Eaton-Lambert syndrome, a history of poliomyelitis, etc.);
- use in the perioperative period of drugs related to prohibited therapy in the study;
- patients who have contraindications to the use of the TOF Watch device (including Pacemaker, etc.);
- patients with II–IV-degree burns;
- patients with a history of hypersensitivity to drugs of the class used (atracurium benzilate, rocuronium bromide, cisatracurium benzilate, pancuronium bromide, vecuronium bromide etc.);

- patients with burdened allergic history (serious systemic manifestations of allergic reactions in history);
- patients who participated in other clinical studies within the last 6 months. or currently participating in other clinical trials;
- any other disease or condition that, in the opinion of the investigator, may confound the results of the study.

Methods to implement

1. Determine the effect of muscle relaxants (aminosteroid and benzyloisoquinoline composition) on neuromuscular conduction including emergency abdominal surgeries using TOF watch sx.

2. Intravenous administration of Kruaron «rocuronium bromide», Ridelat-C «atracurium benzilate» in planned cholecystectomy (research-group1) and in emergency abdominal surgery by conducting a study according to the following criteria: TOF 0, TOF 25 %, TOF 75 % and TOF 90 %

3. After administration of the 1st dose and compile statistics on the result obtained with atracurium benzilate and rocuronium bromide in emergency abdominal surgery (research group2) to see how they differ from laparoscopic cholecystectomy (control group1)

4. Proserine was given for reversal and the time of reversal of Kruaron and Ridelat-C were analysed.

A research work was being carried out on 140 patients in the City Clinical Hospital named after V.V. Vinogradova of the Moscow Healthcare Department» (City Clinical Hospital No.64 of Moscow Department of Healthcare), Russia to assess the variability of muscle relaxants during emergency abdominal surgery in comparison to planned cholecystectomy (the control group). They were being classified into two different groups; the first group of patients $n = 61$ (group 1) who underwent planned laparoscopic cholecystectomy and the other group $n = 79$ (group 2) who underwent emergency abdominal surgeries notably patients with such diagnosis: pancreatitis/pancreanecrosis, peritonitis, severe blood loss and sepsis.

The TOF –reading demonstrates four levels of blockade:

1. Complete blockade
2. Deep blockade
3. Moderate blockade
4. Phase of recovery of NMB

Immediately, after IV administration of muscle relaxant on induction for endotracheal intubation, the TOF watch SX was switched on, at 50mA a small electrical current generated by the later stimulates the ulnar nerve at the site of the connected anode and cathode to create a slight «twitch» a movement of the

thumb where a result was reflected on the screen of the TOF watch. The time for the TOF watch to show zero representing complete muscle relaxation after iv administration of a first dose of muscle relaxant is recorded and further TOF results like 25 %, 75 % and 90 % were recorded. From 60 to 89 % it represents that the effect of muscle relaxant is slowly fading away and from 90 % –100 % it means that the patient can be extubated. The time was meticulously recorded in accordance to the results presented by the TOF watch sx (Fig. 1, 2).

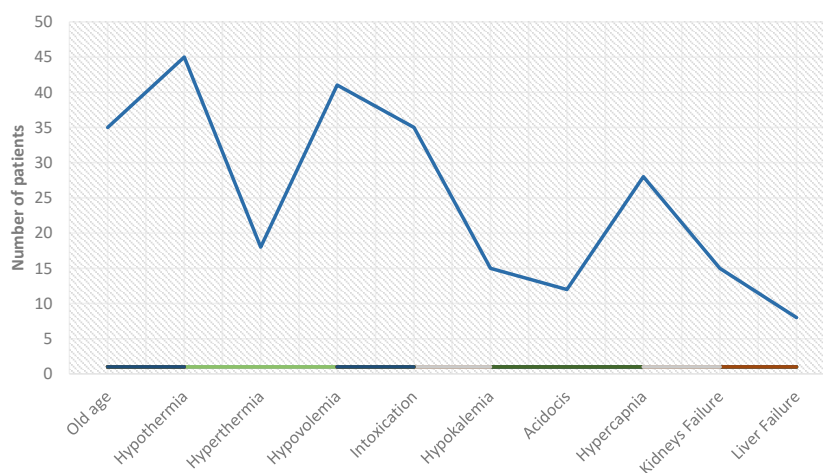


Fig. 1. The effects of different factors on muscle relaxants administered to the patients

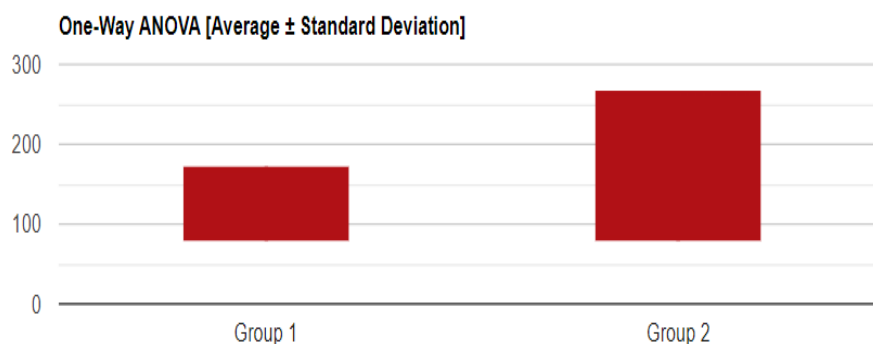


Fig. 2. A comparison of train-of-four stimulation (TOF) 0/sec results of group 1 and 2 patients after administration of an additional supporting dose of Ridelat-C (p -value = 0.036) by ANOVA

Statistical analysis

The statistical analysis of the results was processed in the one-way analysis of variance calculator ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests to determine significance. Differences were considered statistically significant when p value was less than 0.05 ($p < 0.05$), protocol of pre-surgical patient's examination, protocol of combined endotracheal anesthesia, protocol of clinical research, laboratory results, control group1 laparoscopic cholecystectomy [10] and research group emergency abdominal surgery group 2 were used.

Results and Discussion

The selection of the proper muscle relaxant and dosage for induction in emergency abdominal surgery patients was needed. Kruaron, the generic form of rocuronium bromide an amino steroid drug by definition is a rapid acting non- depolarizing intermediate muscle relaxant having all pharmacological effects characteristic

of this class of drugs. It is concurrently blocking N-cholino receptors of the end plate motor neurone. At a dose of 0.60mg/kg for intubation it takes 60seconds to total relaxation of skeletal muscle that is TOF 0. Its clinical duration 0.60 mg/kg is 30 to 40mins at TOF 25 % and around 50mins at TOF 90 %. The middle duration between TOF 25 % to TOF 75 % is 14mins. For a small dose of 0.30–0.45 mg/kg for intubation, it takes 90seconds to reach TOF 0 (very deep muscle relaxation). In relation to the pharmacokinetics, after bolus IV administration of a starting dose its plasmatic concentration undergo through three exponential phases. For healthy adults its half-length of elimination is 66–80mins and its clearances through plasma is estimated to be 3.5–3.9 ml/kg/min. Kruaron is eliminated from the human body through urine or bile.

The tables 1–3 show how the two muscle relaxants varied for the planned cholecystectomy and emergency abdominal surgeries registered throughout the research work.

Table 1

Control group I and emergency group II using Kruaron and Ridelat-C for a first intubating dose

Types of surgeries	Group I		Group II	
	Kruaron R 0.5 mg/kg N = 17	Ridelat C 0.5 mg/kg N = 16	Kruaron R 0.5 mg/kg N = 15	Ridelat C 0.5 mg/kg N = 23
First intubating Dose				
TOF 0	165.9 ± 95	183.3 ± 90	207.1 ± 120	255.5 ± 109.5
TOF 25 %	43.7 ± 9.2	47.3 ± 9.4	37.7 ± 8.2	47.6 ± 12.4
TOF 75 %	64.5 ± 13	63.7 ± 13.1	69.4 ± 23.1	66.5 ± 15.1
TOF 90 %	75.6 ± 15.4	77.5 ± 10.3	94.1 ± 29.3	81.5 ± 16.1

Note: The time of action of Ridelat-C is more as compared to that of Kruaron at train-of-four stimulation (TOF) 0/secs for a first intubating dose.

Table 2

Control group I and emergency group II using Kruaron and Ridelat-C for a first intubating dose and an additional supporting dose

Types of surgeries	Group I		Group II	
	Kruaron R 0.5 mg/kg N = 15	Ridelat C 0.5 mg/kg N = 13	Kruaron R 0.5 mg/kg N = 22	Ridelat C 0.5 mg/kg N = 19
First Intubating Dose				
TOF 0	194.6 ± 132	175.3 ± 96	327.9 ± 193.8	296.8 ± 108.5
TOF 25 %	34.8 ± 10.7	37.2 ± 14.8	38.3 ± 11.9	35 ± 10.3
Additional Supporting dose	0.2 mg/kg	0.2mg/kg	0.2mg/kg	0.2mg/kg
TOF 0	184 ± 97	126.6 ± 46	141 ± 59.5	173.1 ± 93.5
TOF 25 %	43.8 ± 12.3	32.9 ± 15.5	35.6 ± 15.5	35.4 ± 10.2
TOF 75 %	62.2 ± 14.5	43.2 ± 17.6	59.9 ± 30.9	51.6 ± 12.2
TOF 90 %	74 ± 17.3	51.6 ± 18.4	79.9 ± 30.4	60 ± 13.1

Note: The time of action of Ridelat-C is more as compared to that of Kruaron at train-of-four stimulation (TOF) 0/secs for a first intubating dose and an additional supporting dose at TOF0/secs and higher as compared to Table 1.

Table 3

Groups I and II extubation with proserine

Surgeries	Planned Laparoscopic Cholecystectomy Group I		Emergency Abdominal Surgery Group II	
	Kruaron N = 5	Ridelat-C N = 7	Kruaron N = 5	Ridelat-C N = 6
Muscle relaxants/N				
TOF 90 % with Proserine/min	3 ± 0.8	4 ± 2.9	6 ± 4.5	3 ± 1.6
Extubation with Proserine/min	65	117.6	72	79.2
Extubation without Proserine/min	73	122	88.2	100.3

Note: For group II patients more time is taken for Kruaron to be reversed by proserine.

Basically, during the course of the research work being carried out in anesthesiological block where planned laparoscopic cholecystectomy (control group) and emergency abdominal surgeries (experimental group) where the TOF watch SX showed that for planned cholecystectomy of Kruaron on induction at a first intubating dose of 0.50 mg/kg for TOF to reach

zero it took 165.9 ± 95 seconds and for emergency abdominal surgery it took 207.1 ± 120 secs (Table 2). Structural differences for cases of first administration of Kruaron to adults aged 18–60 for TOF readings in minutes showing the variation in percentage are represented on figure 3.

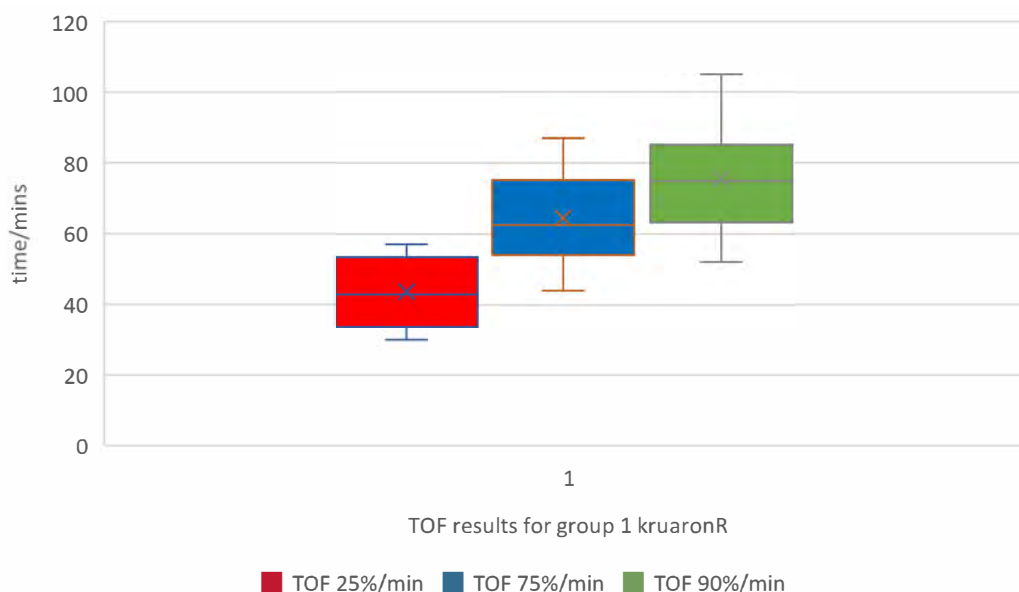


Fig. 3. Structural differences for cases of first administration of Kruaron to adults aged 18–60 for TOF readings in minutes showing the variation in percentage; TOF- train-of-four stimulation

It was problematic for the anesthesiologist because it took longer time to reach TOF 0 and the fact that he had to intubate the patient and the latter was not fully relaxed is highly disturbing. Many incidences of vocal cord injury were registered on intubation.

Intra operation and post-surgery during both planned and emergency surgeries all patients were viewed with hypothermia of a body temperature of 34 ± 0.5 degrees celsius. Mostly on elderly patients aged 65 and above, residual NMB with Kruaron was recorded three hours post-surgery for emergency abdominal surgery patients with sepsis, hypovolemia and massive blood loss TOF showed 50–55 % (Fig. 4).

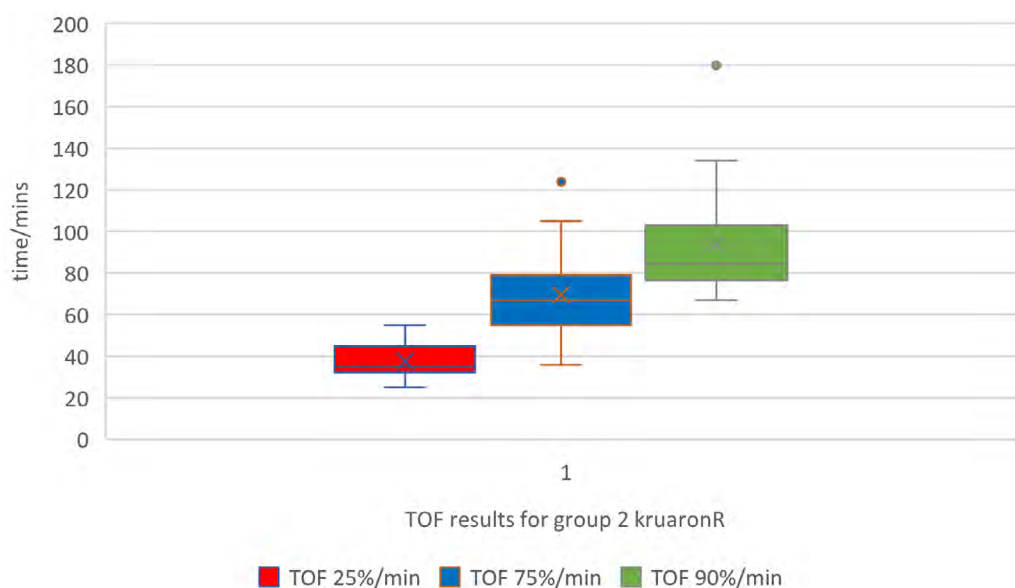


Fig. 4. Structural differences for cases of first administration of Kruaron to adults aged 18–60 for TOF readings in minutes showing the variation in percentage for emergency abdominal surgery, TOF- train-of-four stimulation.

The duration of planned laparoscopic cholecystectomy is one hour and that of emergency abdominal surgery is from 2.5 to 3 hours respectively. For extubation on many instances proserine was used to reverse Kruaron however for emergency patients' reversal was attained at 6 ± 4.5 mins and planned surgery patients at 3 ± 0.8 mins (refer to Table 4). Most of the time during emergency abdominal surgeries extubation cannot be performed because of residual Kruaron in the patient's body hence the later did not react to any stimuli notably: holding the doctor's wrist firmly, extending his head up, confirming whether the intubation tube is disturbing him; and had to be transferred to ICU for prolonged mechanical ventilation support [11]. It is being debated whether or not for emergency abdominal surgeries on critically ill patients with sepsis, kidneys /liver dysfunction, hypovolemic, massive bleeding whether Kruaron is reliable to use or not. Furthermore, if we used Ridelat-C to stop residual NMB this will ease the work of the anesthesiologist in surgical block and extubation also will be quicker without the use of any reversal antidote. Ridelat-C is the generic of atracurium benzilate a non- depolarizing muscle relaxant with peripheral action. It reduces the sensitivity of skeletal

muscle N cholinergic receptors to acetylcholine, inhibiting neuromuscular trans-mission and causing transient skeletal muscle relaxation. It has a rapid onset of action of 2–2.5 minutes, allowing for endotracheal intubation in 90 seconds at an initial dose of 0.5–0.6 mg/kg. At TOF 95 percent, spontaneous recovery after a beginning dose of 0.2–0.6 mg/kg takes about 20–35 minutes. In blood plasma, it takes 1.7–10 minutes to attain plasma Cmax. The duration of the neuromuscular blocking activity is unaffected by the degree of hepatic metabolism or the pace of kidney excretion. It decomposes at physiological blood pH and body temperature without the involvement of enzymes it is hydrolyzed to a limited extent to butyrylcholinesterase (Hoffman elimination) to laudanosine and quaternary mono-acrylate, thus the duration of action is not dependent on the kidneys or the liver. Pharmacologically, metabolites are inactive. The duration of action is unaffected by physiological variations in blood pH. The rate of inactivation slows down under hypothermia (25–26 degrees Celsius). It does not build up in the body and does not reach clinically significant amounts through the placental barrier. T_{1/2} is 20 minutes and half-life are 2–3.4 minutes. The kidneys and the intestines excrete Ridelat-C.

In planned laparoscopic cholecystectomy for TOF to be zero Ridelat-C took 183.3 ± 90 secs Table2 which was normal at a dose of 0.4 mg/kg and for emergency abdominal surgery 255.5 ± 109.5 secs (Table 2). A recovery period for planned cholecystectomy patients at TOF 90 % was recorded at 77.5 ± 10.3

mins (Table 2) and with a maintenance dose of 0.20mg/kg where TOF 90 % was recorded at 51.6 ± 18.4 mins (Table 3). For patients undergoing emergency abdominal surgery TOF 90 % was recorded at 81.5 ± 16.1 (Table 2, Fig. 5, 6).

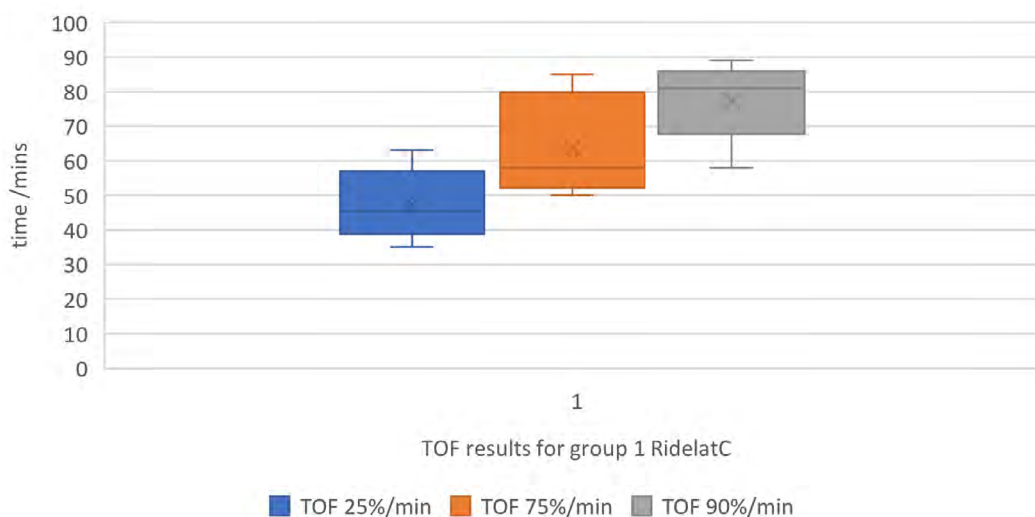


Fig. 5. Structural differences for cases of first administration of Ridelat-C to adults aged 18–60 for TOF readings in minutes for the variation in percentage, TOF- train-of-four stimulation

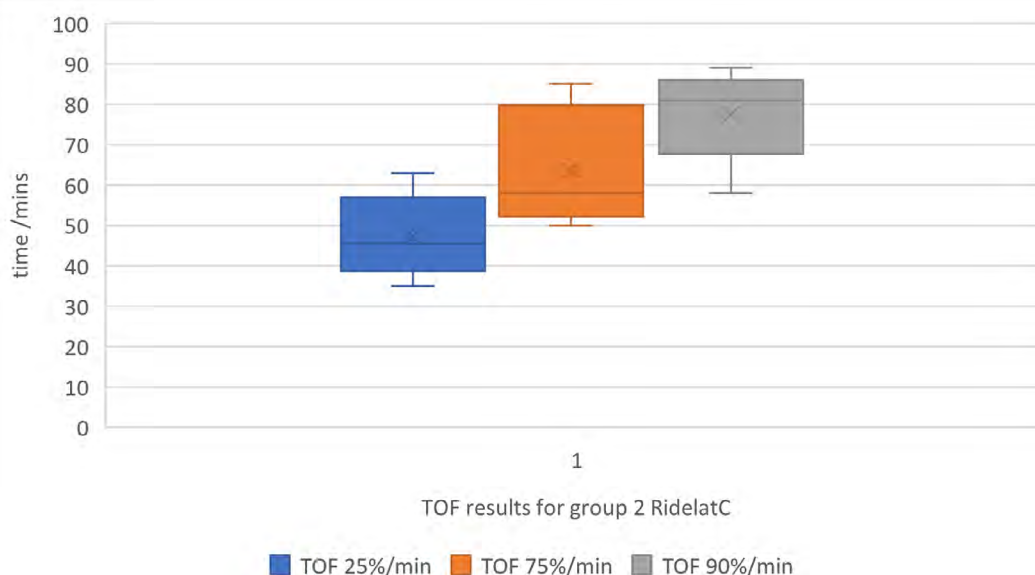


Fig. 6. Structural differences for cases of first administration of Ridelat-C to adults aged 18–60 for TOF readings in minutes showing the variation in percentage for emergency abdominal surgery, TOF- train-of-four stimulation

With a maintenance dose of 0.20mg/kg the recovery time at TOF 90 % was 60 ± 13.1 mins (Table 3). A standard dose can be administered to patients with end stage renal failure or end stage liver failure. Most appropriately Ridelat-C is considered to be more appropriate to use for critically ill emergency abdominal surgery patients with sepsis and massive blood loss, renal and liver failure as compared to Kruaron which has residual NMB effect which is detrimental to human health.

The effect of different drugs, physical and metabolic factors during myoplegy intravenous anesthetics Amaki Y. and co- authors described that on research on mice where ketamine was administered, not only increased the effect of MR but also increased the presynaptic excretion of acetylcholine. During total intravenous anesthesia whereby propofol was used in a time interval more than 20 mins it was estimated that propofol can prolong the duration of non-depolarizing MR Hemmerling T.M. et al, they acted on the central and peripheral hemodynamics changing the pharmacodynamics of MR.

Inhalational anesthetics

Desflurane and sevoflurane enter the synapse quickly because they are less soluble in blood and tissues than other volatile anesthetics supported by Yasuda N. et al. [12]. Non-depolarizing MR's effect is amplified by inhalation anesthesia; as a result, during anesthesia, the frequency and dose of MR are reduced in order to maintain NMConduction, and the duration and recovery time of NMB are extended Cannon J.E., et al.; Saitoh K. et al.; Suzuki T., et al. Desflurane>Sevoflurane> Isoflurane> Halothane> Nitrous Oxide> Barbiturates>Opioids >Propofol> Ketamine are all anesthetics, including intravenous ones, in order of the degree of NMB potentiation. Among others, in the presence of inhalation anesthetics, it is advised to reduce the maintenance dose of muscle relaxant by 20 % of the main dose [13].

Local anesthetics

Despite the sparseness of parenterally administered local anesthetic (LA) overdoses in clinical practice,

anesthesiologists must be aware of how LA might alter the pre and postsynaptic regions of the neuromuscular conduction as well as the activity of the muscle cell. When LA is administered intravenously at doses that are significantly beyond therapeutic levels, neuromuscular conduction without MR is clinically inhibited, and depolarizing and non-depolarizing NM conduction are both boosted at standard doses [14].

Antibiotics

In the absence of MR, most antibiotics are able to inhibit NMC. Antibiotics have a noticeably more significant myoplegic impact when MR is present. For example, aminoglycosides, polymyxins and lincosamides given parenterally in the pre and intraoperative period inhibit the presynaptic release of ACh, lower the sensitivity of receptors to ACh, thereby prolonging the action of MR for many hours [15]. When combined with MR, tetracycline medications enhance NMB, which is then removed by AChP Lee C. et al. Tetracycline medications only have a postsynaptic effect. An antibiotic injected into the pleural and abdominal cavities and then absorbed into the systemic circulation can have a clinically significant myoplegic impact.

Intake of electrolytes

Magnesium sulfate prolongs NMC therefore the dosage of MR has to be minimum [16]. According to certain findings, magnesium sulfate at a dose of 60, 90 mg/kg can function as an antagonist of succinylcholine. If hypercalcemia (2–3 mmol/l) is not treated before surgery, it may be possible to shorten NMB while necessitating more MR. There is an expansion of both depolarizing and non-depolarizing NMC in patients receiving pre- and intraoperative lithium preparations, primarily for mental illness [17].

Other medications

The quinidine series of antiarrhythmic medications work at the level of presynaptic transmission, extending non-depolarizing NMB [18]. Tamoxifen and other anti-estrogen medications have been shown to enhance the effects of non-depolarizing. Mannitol, an osmotic diuretic, has no impact on the depth or

duration of NMB. The strength and duration of both depolarizing and non-depolarizing NMB are increased when furosemide is administered intravenously to individuals with renal impairment at a dose of 1 mg/kg Azar I. et al. Long-term anticonvulsant medication may cause patients to become resistant to non-depolarizing MR, whereas depolarizing MR may cause depolarizing hyper-sensitivity. Prednisolone, dexamethasone, and other steroid medications reduce non-depolarizing MR's effects on people [19]. It is further supported by T. Magorian, K.B. Flanery et al. that succinylcholine may be replaced by rocuronium, a brand-new nondepolarizing muscle relaxant with a fast onset of action but no side effects come with succinylcholine [20]. The authors compared rocuronium, succinylcholine, and vecuronium for rapid sequence anesthetic induction in order to evaluate this theory.

Patients undergoing neurosurgery, aortic surgery, or procedures involving motor-evoked potential (MEP) monitoring face the risk of postoperative mobility issues due to surgical damage. To secure endotracheal tubes during general anesthesia, muscle relaxants like rocuronium are often used but can significantly reduce MEP. Therefore, caution is needed when using muscle relaxants during MEP-monitored procedures.

In Japanese patients undergoing spine surgery, a study explored the impact of neuromuscular blockade (NMB) on MEP [21–23]. The research included adults receiving propofol/remifentanyl anesthesia, rocuronium for intubation, and myogenic MEP monitoring after transcranial stimulation. Sugammadex was administered when MEP configuration was complete, achieving a TOF ratio of 0.7. Factors influencing the TOF ratio included age, blood pressure, hepatic impairment, and rocuronium dose. Higher TOF ratios (0.75) correlated with improved MEP detection success rates.

Out of 373 cases, 221 (59.2 %) received sugammadex. Sugammadex treated patients had a significantly shorter interval between NMB recovery and the start of MEP monitoring compared to control patients ($P < 0.0001$). Patients with a TOF ratio closer to 1 had a higher success rate in MEP detection.

Conclusion

The dosage of Kruaron in emergency abdominal surgery, especially for critically ill patients, required reconsideration due to significant delays in achieving complete muscle relaxation for combined endotracheal anesthesia. It was suggested that an additional dose of 0.1–0.2 mg/kg might be necessary in such cases. Critically ill patients transported to the intensive care unit immediately after emergency abdominal surgery showed residual neuromuscular block with a TOF result of $\leq 60\%$ 2.5 hours later.

Kruaron's elimination was reduced in patients with sepsis, hypovolemic shock, and massive blood loss, either through urine or bile. In contrast, Ridelat-C proved to be effective for endotracheal intubation in patients with sepsis, peritonitis, or massive blood loss due to its elimination mechanism and less of physical counter reactions, it did not depend on the liver of the kidneys to be excreted. However, a calculated dose of Kruaron was needed for patients with stomach regurgitation. Ridelat-C's duration was shorter by 30–35 minutes compared to Kruaron and was quickly eliminated from the body at a TOF 90 %–95 %.

Proserine was used to facilitate extubation and reverse neuromuscular blockade. Reversal of Ridelat-C was significantly faster than Kruaron. Group 2 patients required more time for proserine to be neutralized compared to group 1 patients.

Re-evaluation of a lesser appropriate dosage of Kruaron was essential for group 2 emergency abdominal surgery patients. Also, factors like high temperatures, hormonal drugs (e.g. prednisolone), smoking, obesity, and circadian time with melatonin, could affect the efficacy and duration of muscle relaxants.

This study highlighted the modest connection between neuromuscular blocking agents and neuromuscular dysfunction, as well as their association with acquired critical illness polyneuropathy/myopathy, severe sepsis/septic shock, and massive blood loss/hemorrhagic shock. For emergency critically ill patients, administering a minimal calculated dose of Kruaron or opting for Ridelat-C appeared to be a safer choice. To expedite extubation and save operation time, sugammadex should be used for Kruaron reversal,

given the delayed action of proserine. A new protocol of combined endotracheal intubation for critically ill patients should be introduced.

References

- Freeman SS, Engel AG, Drachman DB. Experimental acetylcholine blockade of the neuromuscular junction. Effects on end plate and muscle fiber ultrastructure. *Ann N Y Acad Sci.* 1976;274:46–59. doi:10.1111/j.1749-6632.1976.tb47675.x
- Fuchs-Buder T, Romero CS, Lewald H, Lamperti M, Afshari A, Hristovska AM, Schmartz D, Hinkelbein J, Longrois D, Popp M, Boer HD, Sorbello M, Jankovic R, Kranke P. Peri-operative management of neuromuscular blockade: A guideline from the European Society of Anaesthesiology and Intensive Care. *Eur J Anaesthesiol.* 2023;40(2):82–94. doi:10.1097/EJA.0000000000001769
- Brull SJ, Murphy GS. Residual neuromuscular block: lessons unlearned. Part II: methods to reduce the risk of residual weakness. *Anesth Analg.* 2010;111(1):129–140. doi:10.1213/ANE.0b013e3181da8312
- Rudolph MI, Ng PY, Deng H, Scheffenbichler FT, Grabitz SD, Wanderer JP, Houle TT, Eikermann M. Comparison of a novel clinical score to estimate the risk of REsidual neuromuscular block Prediction Score and the last train-of-four count documented in the electronic anaesthesia record: A retrospective cohort study of electronic data on file. *Eur J Anaesthesiol.* 2018;35(11):883–892. doi:10.1097/EJA.0000000000000861
- Raval AD, Anupindi VR, Ferrufino CP, Arper DL, Bash LD, Brull SJ. Epidemiology and outcomes of residual neuromuscular blockade: A systematic review of observational studies. *J Clin Anesth.* 2020; 66:109962. doi: 10.1016/j.jclinane.2020.109962
- Domenech G, Kampel MA, García Guzzo ME, Novas DS, Terrasa SA, Fornari GG. Usefulness of intra-operative neuromuscular blockade monitoring and reversal agents for postoperative residual neuromuscular blockade: a retrospective observational study. *BMC Anesthesiol.* 2019;19(1):143. doi:10.1186/s12871-019-0817-4
- Saager L, Maiese EM, Bash LD. Incidence, risk factors, and consequences of residual neuromuscular block in the United States: The prospective, observational, multicenter RECITE-US study. *J Clin Anesth.* 2019;55:33–41. doi: 10.1016/j.jclinane.2018.12.042
- Bash LD, Turzhitsky V, Black W, Urman RD. Neuromuscular Blockade and Reversal Agent Practice Variability in the US Inpatient Surgical Settings. *Adv Ther.* 2021;38(9):4736–4755. doi:10.1007/s12325-021-01835-2
- Li J, Yim S, Pacheck A, Sanchez B, Rutkove SB. Electrical Impedance Myography to Detect the Effects of Electrical Muscle Stimulation in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS One.* 2016;11(3): e0151415. doi:10.1371/journal.pone.0151415
- Kopman AF, Naguib M. Laparoscopic surgery and muscle relaxants: is deep block helpful? *Anesth Analg.* 2015;120(1):51–58. doi:10.1213/ANE.0000000000000471
- Arttime CA, Hagberg CA. Tracheal extubation. *Respir Care.* 2014;59(6):991–1005. doi:10.4187/respcare.02926
- Rose L, McGinlay M, Amin R. Variation in Definition of Prolonged Mechanical Ventilation. *Respir Care.* 2017;62(10):1324–1332. doi:10.4187/respcare.05485
- Yasuda N, Lockhart SH, Eger EI 2nd. Comparison of kinetics of sevoflurane and isoflurane in humans. *Anesth Analg.* 1991;72(3):316–324. doi:10.1213/00000539-199103000-00007
- Li J, Yim S, Pacheck A, Sanchez B, Rutkove SB. Electrical Impedance Myography to Detect the Effects of Electrical Muscle Stimulation in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS One.* 2016;11(3): e0151415. Published 2016 Mar 17. doi:10.1371/journal.pone.015141500007
- Becker DE, Reed KL. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. *Anesth Prog.* 2012;59(2):90–103. doi:10.2344/0003-3006-59.2.90
- Min CH, Min YS, Lee SJ, Sohn UD. The comparative effects of aminoglycoside antibiotics and muscle relaxants on electrical field stimulation response in rat bladder smooth muscle. *Arch Pharm Res.* 2016;39(6):863–870. doi:10.1007/s12272-016-0765-1
- Eizaga Rebolgar R, García Palacios MV, Morales Guerrero J, Torres LM. Magnesium sulfate in pediatric anesthesia: the Super Adjuvant. *Paediatr Anaesth.* 2017;27(5):480–489. doi:10.1111/pan.13129
- Heinz B, Lorenzo P, Markus R, Holger H, Beatrix R, Erich S, Alain B. Postictal ventricular tachycardia after electroconvulsive therapy treatment associated with a lithium-duloxetine combination. *J ECT.* 2013;29(3): e33-e35. doi:10.1097/YCT.0b013e31828b34c6
- Walweel K, Oo YW, Laver DR. The emerging role of calmodulin regulation of RyR2 in controlling heart rhythm, the progression of heart failure and the antiarrhythmic action of dantrolene. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(1):135–142. doi:10.1111/1440-1681.12669
- Yasukawa T, Kaneki M, Yasuhara S, Lee SL, Martyn JA. Steroidal nondepolarizing muscle relaxants do not simulate the effects of glucocorticoids on glucocorticoid receptor-mediated transcription in cultured skeletal muscle cells. *Anesthesiology.* 2004;100(6):1615–1619. doi:10.1097/00000542-200406000-00041
- Tran DTT, Newton EK, Mount VAH, Lee JS, Mansour C, Wells GA, Perry JJ. Rocuronium vs. succinylcholine for rapid sequence intubation: a Cochrane systematic review. *Anaesthesia.* 2017;72(6):765–777. doi:10.1111/anae.13903
- Wang S, Li C, Guo L, Hu H, Jiao Y, Shen J, Tian Y, Zhang J. Survivals of the Intraoperative Motor-evoked Potentials Response in Pediatric Patients Undergoing Spinal Deformity Correction Surgery: What Are the Neurologic Outcomes of Surgery? *Spine.* 2019;44(16): E950-E956. doi:10.1097/BRS.0000000000003030
- Kawaguchi M, Iida H, Tanaka S, Fukuoka N, Hayashi H, Izumi S, Yoshitani K, Kakinohana M. A practical guide for anesthetic management during intraoperative motor evoked potential monitoring. *J Anesth.* 2020;34(1):5–28. doi:10.1007/s00540-019-02698-2

Мониторинг нейро-мышечного блока при экстренной абдоминальной хирургии

Н. Данпут  , М.В. Петрова , В.В. Мороз , А.В. Бутров , М.Ф. Магомедов 

Российский университет дружбы народов, г. Москва, *Российская Федерация*
 dhunputhneelam@gmail.com

Аннотация. *Актуальность.* Во всем мире зарегистрировано около шестидесяти процентов случаев остаточной нервно-мышечной блокады (рНМБ), но вопрос о рНМБ у пациентов в критическом состоянии остается не исследованным. Для прогнозирования наличия остаточного НМБ использовался TOF Watch SX для определения глубины введения миорелаксанта у пациентов, нуждающихся в экстренном хирургическом вмешательстве во время и после операции, даже когда они были транспортированы в отделение интенсивной терапии. *Цель* данного исследования состояла в том, чтобы сравнить варианты нервно-мышечной блокады между плановой лапароскопической холецистэктомией и экстренной абдоминальной хирургией. В исследовании приняли участие 140 пациентов в возрасте 18–60 лет с ИМТ 18–30 кг/м². В I группе была выполнена плановая холецистэктомия (контрольная группа), во II группе — экстренная абдоминальная хирургия (исследовательская группа). Глубину миорелаксации контролировали с помощью часов TOF SX. Назначались два миорелаксанта: Риделат-С, атракурия безилат (Сотекс, компания «Деко», Москва, Россия) и Круарон, рокурония бромид (Верофарм ООО, Харабовск, Россия). Были использованы различные методы, в том числе Drager Fabius, протокол пред-анестезии, протокол исследования, протокол комбинированной эндотрахеальной анестезии, мониторинг динамики, ЭКГ, результаты лабораторных исследований, Microsoft Excel Advanced, ANOVA. *Результаты и обсуждение.* Результаты продемонстрировали глубокую релаксацию скелетных мышц при плановой холецистэктомии: TOF 0 достигался за 165,9 ± 95 секунд для Круарон и 183,3 ± 90 секунд для Ridelat-C. При экстренной абдоминальной хирургии это заняло 207,1 ± 120 секунд для Круарон и 255,5 ± 109,5 секунд для Ridelat-C при TOF0. Примечательно, что Круарон® продемонстрировал пролонгированное действие в группе II, приводя к остаточному нервно-мышечному блоку у больных в критическом состоянии даже через 2,5 часа после операции. *Выводы.* Нервно-мышечные блокаторы умеренно усугубляют нервно-мышечную дисфункцию, потенциально способствуя приобретенным критическим заболеваниям: полиневропатии/миопатии, тяжелому сепсису/септическому шоку и массивной кровопотере/геморрагическому шоку. Для критических больных рекомендуется минимальная расчетная доза Круарон®, тогда как Риделат С, который метаболизируется в плазме крови, не затрагивая почки или печень, может быть лучшим выбором. Сугамадекс был предложен для устранения эффектов Круарон® из-за его быстрого эффекта по сравнению с прозеринном.

Ключевые слова: мониторинг нейромышечного блока, плановая холецистэктомия, экстренная абдоминальная хирургия, Круарон, Риделат-С, остаточный нейро-мышечный блок.

Информация о финансировании. Исследование выполнено при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Вклад авторов. Данпут Н. — концепция исследования, сбор данных; Петрова М., Данпут Н. — анализ полученных данных; Данпут Н., Мороз В., Магомедов М. — ввод полученных данных, анализ полученных данных; Данпут Н., Бутров А. — написание текста. Каждый автор внес личный вклад в интерпретацию данных и написание рукописи. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

Этическое утверждение. Перед началом исследования было получено разрешение этического комитета медицинского института РУДН, Москва, Российская федерация.

Благодарности. Искренняя благодарность всем участникам и техническому персоналу за их поддержку.

Информированное согласие на публикацию. От пациентов было получено добровольное письменное согласие на исследование и публикацию соответствующей медицинской информации в соответствии с Хельсинкской декларацией WMA — Этические принципы медицинских исследований с участием человека, 2013 г.

Поступила 16.10.2023. Принята 14.11.2023.

Для цитирования: *Dhunpath N., Petrova M.V., Moroz V.V., Butrov A.V., Magomedov M.A.* Monitoring of Neuromuscular block during emergency abdominal surgery // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 428–440. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–428–440

Corresponding author: Neelam Dhunpath — PhD student of the Department of Anesthesiology and Reanimatology with the course of rehabilitology, Institute of Medicine, RUDN University, 117198, Miklukho- Maklaya str., 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: dhunpathneelam@gmail.com

Dhunpath N. ORCID 0009–0004–7058–5021

Petrova M.V. ORCID 0000–0003–4272–0957

Moros V.V. ORCID 0000–0002–3467–7170

Butorov A.V. ORCID 0000–0003–4462–1530

Magomedov M.A. ORCID 0000–0002–1972–7336

Ответственный за переписку: Данпут Нилам — аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии с курсом медицинской реабилитации, медицинский институт РУДН, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: dhunpathneelam@gmail.com

Данпут Н. ORCID 0009–0004–7058–5021

Петрова М.В. ORCID 0000–0003–4272–0957













Мороз В.В. ORCID 0000–0002–3467–7170

Бутров А.В. ORCID 0000–0003–4462–1530

Магомедов М.А. ORCID 0000–0002–1972–7336


DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-441-448
EDN: JUKQVEORIGINAL RESEARCH
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Macrophage population state and proliferative activity of spleen cells under liver regeneration conditions

Aiaz T. Mamedov¹ , Elena A. Gantsova² , Viktoria V. Kiseleva³ ,
Anastasia V. Lokhonina^{2,3} , Andrey V. Makarov¹ , Svetlana A. Turygina¹ ,
Irina A. Bicherova¹ , Irina V. Arutyunyan^{2,3} , Polina A. Vishnyakova³ ,
Andrey V. Elchaninov^{1,2}  , Timur Kh. Fatkhudinov^{2,3} 

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

²Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russian Federation

³National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named After Academician V.I. Kulakov
Moscow, Russian Federation
 elchandrey@yandex.ru

Abstract. Relevance. Currently, the participation of immune system cells in the regulation of reparative processes is attracting more and more attention of researchers. There is an anatomical connection between the liver and spleen by means of portal vein. Thus, cytokines and other biologically active substances can enter the liver from the spleen through the portal vein, as well as cells can migrate to the liver. However, the specific mechanisms of mutual influence of the mentioned organs, including in reparative processes, remain poorly studied. *The aim* of our work was to study the state of spleen monocyte-macrophage population after liver resection, as well as the proliferative activity of spleen cells during liver regeneration. *Materials and Methods.* The model of liver regeneration after 70 % resection in mouse was reproduced in this work. The animals were taken out of the experiment after 1, 3 and 7 days. The marker of cell proliferation Ki67 was immunohistochemically detected, the state of spleen monocyte-macrophage population was evaluated by markers CD68, CD115, CD206, F4/80 by methods of immunohistochemistry and flow cytometry. *Results and Discussion.* The liver regeneration had a pronounced effect on the cytoarchitectonics of the spleen. In 1 day after liver resection in the spleen there was observed a decrease in the share of Ki67+cells, according to the flow cytometry data there was a decrease in the number of CD115+cells, in 3 and 7 days there was a decrease in the number of F4/80+ macrophages. *Conclusion.* Liver resection causes changes in the state of cell populations of the spleen as well. First of all, to the decrease in the activity of proliferative processes in it, as well as to the changes in the state of the monocyte-macrophage system. A decrease in the content of CD115+ and F4/80+ cells in the spleen was found, which indirectly indicates the migration of monocytes/macrophages after liver resection, which can also influence the course of reparative processes in the liver.

© Mamedov A.T., Gantsova E.A., Kiseleva V.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Turygina S.A.,
Bicherova I.A., Arutyunyan I.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. M., 2023



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

Keywords: regeneration, liver, resection, spleen, macrophages

Funding. The work was performed with the financial support of State assignment 123030700110–4, grant MK-1573.2022.3 from the President of the Russian Federation to support young scientists, and grant 22–14–00152 from the Russian Science Foundation.

Author contributions. A.T. Mamedov, E.A. Gantsova, V.V. Kiseleva, A.V. Elchaninov — conducting experiments with animals; A.V. Lokhonina, S.A. Turygina, I.A. Bicherova, I.V. Arutyunyan — immunohistochemical study; A.V. Elchaninov, P.A. Vishnyakova, A.V. Makarov, T. Kh. Fatkhudinov — concept and design of the study; A.T. Mamedov, A.V. Elchaninov — editing the manuscript. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, and read and approved the final version before publication.

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

Acknowledgements — not applicable.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Commission of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology (Protocol No. 29(5), dated November 8, 2021), Moscow, Russian Federation.

Consent for publication — not applicable.

Received 05.10.2023 Accepted 30.10.2023.

For citation: Mamedov AT, Gantsova EA, Kiseleva VV, Lokhonina AV, Makarov AV, Turygina SA, Bicherova IA, Arutyunyan IV, Vishnyakova PA, Elchaninov AV, Fatkhudinov TKh. Macrophage population state and proliferative activity of spleen cells under liver regeneration conditions. *RUDN Journal of Medicine*. 2023; 27(4):441–448. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–441–448

Introduction

The immune system together with the nervous and endocrine systems belongs to the regulatory systems of the mammalian organism. Nowadays, the participation of immune system cells in the regulation of reparative processes is attracting more and more attention of researchers. There is a direct anatomical connection between some immune and non-immune organs. Therefore, mutual influence and coordinated changes in the development of pathological and reparative processes often attract attention. First of all, we are talking about the interaction between the spleen and the liver within the framework of the so-called hepatic-spleen axis [1]. The basis of this interaction is the portal circulation linking the spleen and liver, as well as the presence of common barrier and immune functions [1]. Despite the direct connection of the liver and spleen, the specific mechanisms of mutual influence of these organs, including reparative processes, remain poorly understood [2].

Most studies of the hepatic-spleen axis have been performed in patients with liver cirrhosis of various etiologies or on appropriate models in laboratory animals. In this regard, special attention was paid to the factors of liver Ito cell activation, which are responsible for the excessive production of intercellular substance components [3]. It has been found that during the development of hepatitis and cirrhosis both in experiment [4] and in patients [5] there is an activation of TGFb1 synthesis by macrophages of the red pulp of the spleen, which reaches the liver through the portal vein, where it activates Ito cells (hepatic stellate cells). In other works, on the contrary, the potential possibility of favorable influence of spleen on reparative processes in the liver is shown. Thus, it was found that in the spleen there is an increase in gene expression of a number of interleukins, as well as hepatocyte growth factor HGF after liver resection [6, 7]. Probably, the spectrum of biologically active substances synthesized in the spleen is much wider in the spleen after liver resection; however, this issue remains poorly studied.

In addition to being a source of synthesis of cytokines and growth factors regulating inflammation and reparative processes, the spleen can also serve as a source of migrating cells. Currently, there is evidence that the spleen deposits monocytes, from where they migrate to the focus of damage, which was shown in the model of ischemic myocardial and brain damage [8, 9].

It is well known that monocytes/macrophages as well as other leukocytes migrate to the liver after it has been damaged by toxic substances or resection [10–12]. There are no data on the role of the spleen in this process, as well as there are no studies on the state of the monocyte/macrophage population of the spleen during liver regeneration. Purpose of research: based on the given data, the interaction between the spleen and the liver after its resection remains poorly studied. Thus, the aim of our work was to study the state of spleen monocyte-macrophage population after liver resection, as well as the proliferative activity of spleen cells during liver regeneration.

Materials and methods

Animals

Male mice of the C57Bl line, weight 20–22 g, obtained from the animal nursery «Stolbovaya» (Chekhov, Moscow region, Russia) of the Federal State Budgetary Institution of Science «Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency» were used. Animals were kept in plastic cages at 22 ± 1 °C under natural light with free access to standard food for laboratory rodents and water. The conditions of laboratory animals were in accordance with the USSR Ministry of Health Order No. 755 of 12.08.1977 and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments or Other Scientific Purposes (Strasbourg, March 18, 1986).

Experimental model

In male C57bl/10 mice ($n = 18$), a 70 % resection was performed under general isoflurane anesthesia according to the method of Higgins and Anderson [13]. The operation was performed from 10.00 p.m. to 11.00

p.m.p.m. Animals were removed from the experiment after 24h, 72h and 7 days using CO₂-chamber. Intact ($n = 6$) as well as falsely operated animals ($n = 15$) were used as controls. All experiments were performed in accordance with the Geneva Convention «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990), as well as the Helsinki Declaration of the World Medical Association on Humane Treatment of Animals (edition of 2000) The study was approved by the Bioethics Commission of the FGBNU Research Institute of Human Morphology (Protocol no. 29 (5), dated 08.11.2021).

Immunohistochemical study

Spleen fragments were rapidly frozen in liquid nitrogen, then cryosections were prepared and incubated with the first antibodies for 12 h, then for 1 h with the corresponding second antibodies conjugated with fluorophores (FITC or PE) (1:200, Abcam, UK). Antibodies against Ki67 (1:100, Abcam, UK) were used to examine cell proliferation, and antibodies against CD68 (1:100, Abcam, UK), against CD163 (1:100, Abcam, UK), and against CD206 (1:100, Abcam, UK) were used to detect the macrophage population. nuclei were dock-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Co LLC). On cryosections stained with one or another antibody, an index of the corresponding positively stained cells was determined as the ratio of labeled cells to the total number of cells studied. For each index at least 3000 cells were studied, the index value was expressed in %.

Flow cytometry analysis

In animals removed from the experiment, the spleen was removed and placed in Hanks' solution (PanEco, Russia). The organ was washed twice with Hanks' solution. The leukocyte fraction was separated from the stromal fraction using a 40 µm nylon filter (SPL LifeScience, South Korea). Spleen tissues were mechanically disaggregated, minced and incubated in 0.05 % solution of collagenase cocktail of types 1 and 4 (PanEco, Russia) for 25 min at 37 °C on an orbital shaker. The resulting cell suspension was passed through a 100 µm nylon filter (SPL LifeScience, South Korea)

and was washed twice from enzymes in Hanks' solution containing 10 % fetal calf serum (PAA Lab., Austria) (500 g, 10 min, 20 °C). Erythrocytes were then lysed with Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Immunophenotyping of the obtained cells was performed according to the following markers: Ly6C, F4/80, CD115. Cells were incubated with antibodies according to the manufacturer's protocol. Cells were then washed in PBS, resuspended in 0.3 ml PBS and transferred to flow cytometry tubes for analysis on a BD FACSAria III instrument (Becton Dickinson, USA). At least 10,000 cells were analyzed in each measurement.

For immunophenotyping of macrophages, a number of markers reflecting one or another of their functions have been selected. Ly6C, a protein thought to be essential for monocyte migration, CD115 is a receptor for M-CSF. CD68 (macrosialin) is a key protein involved in endocytosis, recognizes lectins and selectins, which allows the macrophage to move on selectin-containing surfaces, including the surface of other cells [14]. CD163 scavenger receptor of hemoglobin-haptoglobin complexes, is also able to bind to bacteria [15]. CD206 receptor recognizes terminal residues of mannose, N-acetylglucosamine and fucose on glycans attached to proteins of some microorganisms, anti-inflammatory function includes binding and removal from the bloodstream of glycoproteins released during inflammation (hydrolases, tissue plasminogen activator, neutrophil myeloperoxidase) [16].

Statistical analysis. The obtained data were analyzed using SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., USA). Comparison of two samples was performed using the Mann-Whitney (U) criterion. For comparison of more than two groups, a ranked one-factor analysis of variance was used. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

The hepatic-spleen axis of interorgan interaction was first discovered and studied in developing liver fibrosis. In such conditions, removal of the spleen, as a rule, had a favorable effect on the liver — a decrease

in the severity of fibrotic changes was noted [1, 17]. The following mechanism was supposed. During the development of hepatitis of various etiologies and subsequent fibrosis there is a permanent death of hepatocytes. Their decay products get into the systemic bloodstream and reach the spleen, where they stimulate the secretion of various cytokines and growth factors, primarily those that support a high level of inflammation and excessive formation of connective tissue in the liver [4, 5]. Cytokines synthesized in the spleen reach the liver through the portal vein and cause a new wave of cell death of hepatocytes. Thus, the circle is closed. Splenectomy removes the source of cytokines damaging the liver, thus breaking the vicious circle [2].

However, the effect of the spleen on the liver is not so unambiguously negative. Liver resection led to changes in cytoarchitectonics of the spleen. First of all, liver resection led to a statistically significant decrease in the proliferative activity of spleen cells. The decrease in the number of Ki67+ cells was observed both in the red and white pulp. The proliferative activity in the red pulp significantly decreased 1 day after liver resection, 3 and 7 days after the operation did not differ from the control values (Figure 1). In white pulp there was a longer decrease in the number of Ki67+ cells, proliferative activity returned to control values only by 7 days (Figure 1). Probably, liver resection has a depressing effect on hematopoiesis in the spleen, in connection with which defense mechanisms are activated in it [18].

Liver resection resulted in changes in the monocyte-macrophage population in the spleen. When analyzing histological preparations, it can be noted that CD68+ cells are localized in the red pulp, as well as CD163+ cells, while CD206+ cells are associated mainly with lymphoid nodules. This distribution of macrophages is characteristic of both the spleens of control and experimental animals. Liver resection did not significantly affect the topography of the indicated types of macrophages. Only 1 day after liver resection, one can note an increase in the number of CD206+deprived lymphoid nodules. In case of CD163+ cells, 1 day after liver resection, staining with appropriate antibodies gave brighter glowing.

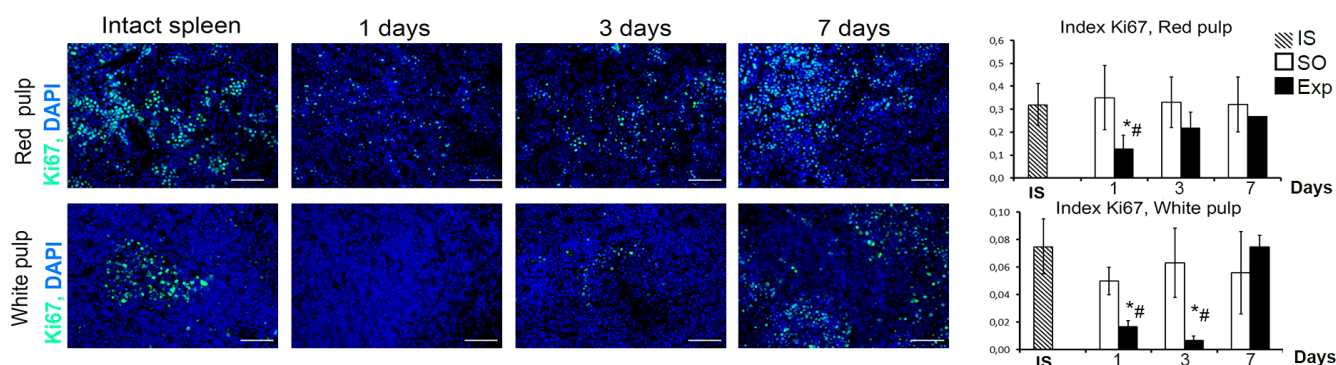


Fig. 1. Cell proliferation activity in the spleen during liver regeneration after 70 % resection. IS – intact spleen, SO – sham-operated control, RP – spleen of animals in which liver resection was performed, scale bars – 50 μ m, diagrams show average values \pm st. deviation, * – statistically significant difference compared to sham-operated control ($p < 0.05$), # – statistically significant difference compared to intact control ($p < 0.05$)

The study using flow cytometry revealed significant changes in the population of spleen macrophages in response to liver resection. It was found that in the total spleen cell population the number of CD115+ cells was significantly lower compared to the control only after 1 day, Ly6C+ cells throughout the study period, and F4/80+ cells at 3 and 7 after liver resection (Figure 2).

Similar data were obtained in those studies showing migration of deposited monocytes from the spleen into damaged organs [8, 9]. Thus, it can be assumed that during liver regeneration the monocytes migrating to the liver were also deposited initially in the spleen.

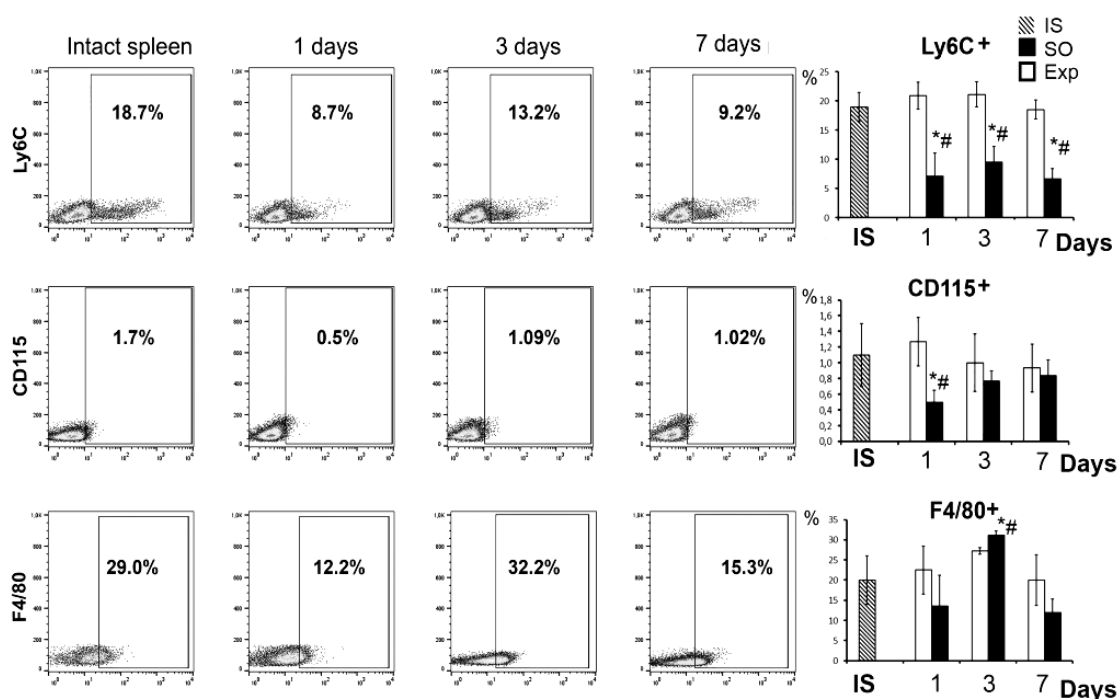


Fig. 2. The state of the monocyte-macrophage system in the spleen during liver regeneration after 70 % resection. IS – intact spleen, SO – sham-operated control, RP – spleen of animals in which liver resection was performed, scale bars – 50 μ m, diagrams show average values \pm st. deviation, * – statistically significant difference compared to sham-operated control ($p < 0.05$), # – statistically significant difference compared to intact control ($p < 0.05$).

The very fact of monocyte migration into the regenerating liver can be considered as a positive effect of the spleen. Block of monocyte/macrophage migration into the liver after its resection leads to a slowdown of regenerative processes in it [19].

Thus, the accumulated data indicate both possible positive and negative effects of the spleen on reparative processes in the liver. What are such contradictions connected with? In our opinion, with the nature of those injuries, in which reparative processes in the liver and their interrelation with the spleen were studied. In those cases, when there is a pronounced death of hepatocytes, such as in hepatitis, liver fibrosis, the spleen becomes an additional source of synthesis of damaging cytokines, its removal stimulates reparative processes in the liver. In case of liver resection the level of cell death of hepatocytes is minimal [20], no products of their death enter the spleen through the systemic blood flow, and there is no excessive production of proinflammatory cytokines in the spleen. At the same time, if the spleen is removed under conditions of liver resection, it can lead to impaired migration of monocytes or any biologically active substances and, as a consequence, to impaired reparative processes. Probably, this partly explains the results of those works, in which the negative effect of splenectomy on the state of the liver in norm and regeneration after 70 % resection was shown [21–23].

Conclusion

Liver resection causes changes in the cytoarchitectonics of cell populations of the spleen. First of all, there is a decrease in the activity of proliferative processes in it, as well as changes in the state of the monocyte-macrophage system. A decrease in the content of CD115+ and F4/80+ cells in the spleen was found, which indirectly indicates the migration of monocytes/macrophages after liver resection.

References/ Библиографический список

1. Li L, Duan M, Chen W, Jiang A, Li X, Yang J, Li Z. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *J Transl Med.* 2017;15(1):111. doi:10.1186/s12967-017-1214-8

2. Elchaninov A, Vishnyakova P, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Spleen: Reparative Regeneration and Influence on Liver. *Life.* 2022;12(5):626. doi:10.3390/LIFE12050626

3. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:27–42. doi:10.1016/j.addr.2017.05.007

4. Akahoshi T, Hashizume M, Tanoue K, Shimabukuro R, Gotoh N, Tomikawa M, Sugimachi K. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor beta-1. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(1):59–65. doi: 10.1046/j.1440-1746.2002.02667.x

5. Asanoma M, Ikemoto T, Mori H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Cytokine expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk. *Hepatol Res.* 2014;44(12):1217–1223. doi:10.1111/hepr.12267

6. Yin S, Wang H, Park O, Wei W, Shen J, Gao B. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3. *Am J Pathol.* 2011;178(4). doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.001

7. Kono S, Nagaike M, Matsumoto K, Nakamura T. Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;186(2):991–998. doi:10.1016/0006-291X(92)90844-B

8. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science.* 2009;325(5940):612–616. doi:10.1126/science.1175202

9. Rizzo G, Maggio R Di, Benedetti A, Morroni J, Bouche M, Lozanoska-Ochser B. Splenic Ly6Chi monocytes are critical players in dystrophic muscle injury and repair. *JCI Insight.* 2020;5(2). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.130807

10. Zigmund E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, Varol C. Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *J Immunol.* 2014;193(1):344–353. doi:10.4049/jimmunol.1400574

11. Elchaninov A, Nikitina M, Vishnyakova P, Lokhonina A, Makarov A, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Macro- and microtranscriptomic evidence of the monocyte recruitment to regenerating liver after partial hepatectomy in mouse model. *Biomed Pharmacother.* 2021;138:111516. doi:10.1016/j.biopha.2021.111516

12. Goh YPS, Henderson NC, Heredia JE, Eagle AR, Odegaard JI, Lehwald N, Nguyen KD, Sheppard D, Mukundan L, Locksley RM, Chawla A. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(24):9914–9919. doi:10.1073/pnas.1304046110

13. Nevzorova Y, Tolba R, Trautwein C, Liedtke C. Partial hepatectomy in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1_suppl):81–88. doi:10.1177/0023677215572000

14. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, Kastenberger M, Brockhoff G, Andreesen R, Kreutz M. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scand J Immunol.* 2008;67(5):453–463. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x













15. Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RPM, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009;113(4):887–892. doi:10.1182/blood-2008-07-167064

16. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol.* 2012;92(6):1177–1186. doi:10.1189/jlb.0512231

17. Tarantino G, Scalera A, Finelli C. Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infections and metabolism. *World J Gastroenterol.* 2013;19(23):3534. doi:10.3748/wjg.v19.i23.3534


18. Novince CM, Koh AJ, Michalski MN, Marchesan JT, Wang J, Jung Y, Berry JE, Eber MR, Rosol TJ, Taichman RS, McCauley LK. Proteoglycan 4, a Novel Immunomodulatory Factor, Regulates Parathyroid Hormone Actions on Hematopoietic Cells. *Am J Pathol*. 2011;179(5):2431–2442. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.032
19. You Q, Holt M, Yin H, Li G, Hu CJ, Ju C. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(6):836–843. doi:10.1016/j.bcp.2013.07.006
20. Elchaninov AV, Fatkhudinov TK, Kananykhina EY, Arutyunyan IV, Makarov AV. Proliferation and cell death of hepatocytes after subtotal liver resection in rats. *Clin Exp Morphol*. 2016;(3):22–29.
21. Babaeva AG. Cellular and humoral immunity factors as regulators of regenerative morphogenesis. *Ontogenez*. 1989;20(5):453–460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2531358>. Accessed November 11, 2019.
22. Babaeva AG, Zotikov EA. *Immunology of Processes of Adaptive Growth, Proliferation and Their Disorders*. Moscow: Medicine; 1987. 258 p. [Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений. Москва: Медицина. 1987. 286 с.] (in Russian)
23. Makarova OV, Nechai VV, Khomyakova TI, Kosyreva AM. Pathomorphology of experimental postsplenectomic syndrome. *Clin Exp Morphol*. 2012;(1):31–34.

Состояние макрофагальной популяции и пролиферативная активность клеток селезенки в условиях регенерации печени

А.Т. Мамедов¹ , Е.А. Ганцова² , В.В. Киселева³ ,
 А.В. Лохонина^{2,3} , А.В. Макаров¹ , С.А. Турыгина¹ ,
 И.А. Бичерова¹ , И.В. Арутюнян^{2,3} , П.А. Вишнякова³ ,
 А.В. Ельчанинов^{1,2}  , Т.Х. Фатхудинов^{2,3} 

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, г. Москва, Российская Федерация
 elchandrey@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* В настоящее время все большее внимание исследователей привлекает участие клеток иммунной системы в регуляции репаративных процессов. Между печенью и селезенкой существует анатомическая связь посредством портальной вены. Таким образом, через портальную вену в печень из селезенки могут поступать цитокины и других биологически активных веществ, а также мигрировать клетки. Однако конкретные механизмы взаимного влияния указанных органов, в том числе при репаративных процессах, остаются мало изученными. Целью настоящей работы было изучить состояние моноцитарно-макрофагальной популяции селезенки после резекции печени, а также пролиферативная активность клеток селезенки при регенерации печени. Материалы и методы. В работе была воспроизведена модель регенерации печени после 70 % резекции у мыши. Животных выводили из эксперимента через 1 сут., 3 сут. и 7 сут. Иммуногистохимически выявляли маркер клеточной пролиферации Ki67, состояние моноцитарно-макрофагальной популяции селезенки оценивали по маркерам Ly6C, CD115, CD68, CD163, CD206 и F4/80 методами иммуногистохимии и проточной цитометрии. *Результаты и обсуждение.* Регенерация печени оказывала выраженной влияние на цитоархитектонику селезенки. Через 1 сутки после резекции печени в селезенке наблюдали снижение доли Ki67+клеток, по данным проточной цитометрии обнаружено уменьшение числа CD115+клеток, через 3 и 7 суток уменьшение числа F4/80+ макрофагов. *Выводы.* Резекция печени вызывает изменения и в состоянии клеточных популяций селезенки. В первую очередь, к снижению активности пролиферативных процессов в ней, а также к изменению состояния моноцитарно-макрофагальной системы. Установлено снижение содержания CD115+ и F4/80+клеток в селезенке, что косвенно свидетельствует о миграции моноцитов/макрофагов после резекции печени, что также может оказывать влияние на течение репаративных процессов в печени.

Ключевые слова: регенерация, печень, резекция, селезенка, макрофаги

Информация о финансировании: работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания 123030700110–4, гранта Президента РФ для поддержки молодых ученых МК-1573.2022.3, гранта РНФ 22–14–00152.

Вклад авторов: А.Т. Мамедов, Е.А. Ганцова, В.В. Киселева, А.В. Ельчанинов — проведение экспериментов с животными, С.А. Турыгина, И.А. Бичерова, И.В. Арутюнян — иммуногистохимическое исследование, А.В. Ельчанинов, П.А. Вишнякова, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов — концепция и дизайн исследования, А.Т. Мамедов, А.В. Ельчанинов — редактирование рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

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

Этическое утверждение. Исследование одобрено комиссией по биоэтике ФГБНУ НИИ морфологии человека (Протокол № . 29 (5), от 08.11.2021).

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. Неприменимо.

Поступила 05.10.2023. Принята 30.10.2023.











Для цитирования: Mamedov A.T., Gantsova E.A., Kiseleva V.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Turygina S.A., Bicherova I.A., Arutyunyan I.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. Macrophage population state and proliferative activity of spleen cells under liver regeneration conditions // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 441–448. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–441–448

Corresponding author: Elchaninov Andrey Vladimirovich — PhD, MD, Associate Professor, Head of the Laboratory of Growth and Development of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky National Research Centre of Surgery», 117418, Tsyurupa Street 3, Moscow, Russian Federation. E-mail: elchandrey@yandex.ru
Mamedov A.T. ORCID 0009–0002–3218–250X
Gantsova E.A. ORCID 0000–0003–4925–8005
Kiseleva V.V. ORCID 0000–0002–3001–4820
Lokhonina A.V. ORCID 0000–0001–8077–2307
Makarov A.V. ORCID 0000–0003–2133–2293
Turygina S.A. ORCID 0009–0003–4242–4397
Bicherova I.A. ORCID 0009–0005–8538–3614
Arutyunyan I.V. ORCID 0000–0002–4344–8943
Vishnyakova P.A. ORCID 0000–0001–8650–8240
Elchaninov A.V. ORCID 0000–0002–2392–4439
Fatkhudinov T. Kh. ORCID 0000–0002–6498–5764

Ответственный за переписку: Ельчанинов Андрей Владимирович — доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией роста и развития «Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Российская Федерация, 117418, Москва, улица Цюрупы, д. 3, E-mail: elchandrey@yandex.ru
Мамедов А.Т. ORCID 0009–0002–3218–250X
Ганцова Е.А., SPIN 6486–5795; ORCID 0000–0003–4925–8005
Киселева В.В. SPIN2698–1448; ORCID 0000–0002–3001–4820
Лохонина А.В. SPIN 4521–2250; ORCID 0000–0001–8077–2307
Макаров А.В. SPIN 3534–3764; ORCID 0000–0003–2133–2293
Турыгина С.А. SPIN 4746–9334; ORCID 0009–0003–4242–4397
Бичерова И.А. ORCID 0009–0005–8538–3614
Арутюнян И.В. SPIN 5220–1893; ORCID 0000–0002–4344–8943
Вишнякова П.А. SPIN 3406–3866; ORCID 0000–0001–8650–8240
Ельчанинов А.В. SPIN 5160–9029; ORCID 0000–0002–2392–4439
Фатхудинов Т.Х. SPIN 7919–8430; ORCID 0000–0002–6498–5764

DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-449-458
EDN: JDEJXSORIGINAL RESEARCH
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Migration, proliferation and cell death of regenerating liver macrophages in an experimental model

Maria V. Grinberg¹ , Anastasia V. Lokhonina² , Polina A. Vishnyakova² ,
Andrey V. Makarov³ , Eugenia Yu. Kananykhina⁴ , Irina Z. Eremina¹ ,
Valeria V. Glinkina³ , Andrey V. Elchaninov⁴  , Timur Kh. Fatkhudinov⁴ 

¹ RUDN University, Moscow, Russian Federation

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named After Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

⁴ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russian Federation

 elchandrey@yandex.ru

Abstract. Relevance. Macrophages are the leading regulatory cell-lineage taking part in reparative processes in mammals, and the liver is no exception. The ratio of monocyte migration, proliferation and death of macrophages during liver regeneration requires further studies. *The aim* was to quantify the intensity of monocyte migration, cell proliferation and apoptosis of resident liver macrophages after its 70 % resection in a mouse model. *Materials and Methods.* We performed 70 % liver resection in sexually mature male BalbC mice. Cells of liver monocyte-macrophage system were obtained by magnetic sorting by marker F4/80. The immunophenotype of the isolated cells was further studied by cytofluorimetry, the level of proliferation and cell death, the content of cyclins and P53 was determined by western blot. *Results and Discussion.* It was found that after partial hepatectomy there is a marked migration of monocytes/macrophages positive for Ly6C and CD11b markers to the liver, the migration process starts already in the first day after the operation. On the same terms there is a rise in proliferative activity of macrophages, established by Ki67 marker, the peak of proliferation — 3 days after partial hepatectomy. A significant increase in the number of dying macrophages was found early after liver resection. *Conclusion.* The obtained data indicate that liver regeneration in mammals on the model in mice is accompanied by proliferation migration and cell death of macrophages. Taking into account the immunophenotype of macrophages, we can conclude that Ly6C+ blood monocytes migrate to the liver, and resident macrophages participate in proliferation. The obtained data confirm the universality of the course of reparative processes in mammals.

© Grinberg M.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Kananykhina E.Yu., Eremina I.Z., Glinkina V.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh., 2023



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

Keywords: liver, regeneration, macrophages, migration, proliferation, apoptosis

Funding. The work was performed with the financial support of State assignment № 121040600436–7, and grant 22–14–00152 from the Russian Science Foundation.

Author contributions. M.V. Grinberg, E. Yu. Kananykhina, I.Z. Eremina, A.V. Elchaninov — conducting experiments with animals, A.V. Lokhonina, A.V. Makarov, I.V. Arutyunyan — immunohistochemical study, A.V. Elchaninov, P.A. Vishnyakova, V.V. Glinkina, T. Kh. Fatkhudinov — concept and design of the study, A.V. Elchaninov, V.V. Glinkina — editing the manuscript.

All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, and read and approved the final version before publication.

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

Acknowledgements — not applicable.

Ethics approval. The study was approved by the bioethics commission of the Federal State Budgetary Institution Research Institute of Human Morphology (Protocol № . 3, 01.02.2019), Moscow, Russian federation.

Consent for publication — not applicable.

Received 15.10.2023 Accepted 14.11.2023.

For citation: Grinberg MV, Lokhonina AV, Makarov AV, Kananykhina EYu, Eremina IZ, Glinkina VV, Vishnyakova PA, Elchaninov AV, Fatkhudinov TKh. Migration, proliferation and cell death of regenerating liver macrophages in an experimental model. *RUDN Journal of Medicine*. 2023; 27(4):449–458. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–449–458

Introduction

Regeneration is an inherent property of all living organisms. Considering the regenerative ability of animals, it is possible to pay attention to the fact that it acquires the most diverse forms in the course of phylogenesis. However, despite the differences in the course of the regenerative process in different animals, many similar features are also identified: activation of similar signaling pathways, the presence of cell dedifferentiation/transdifferentiation, proliferation and cell death [1]. An integral part of the regeneration process in highly organized multicellular animals is the involvement of macrophages [2–4]. Given the large number of similarities, many researchers have suggested that the regenerative capacity in animals is homologous [1, 5].

The liver is characterized by a significant capacity for regeneration. At the same time, the reparative process in the liver is characterized by the same features as regeneration in other classes of animals: activation of signaling pathways regulating the processes of liver

development and growth, activation of cell death, cell proliferation, and, in case of viral or toxic damage, cell transdifferentiation processes [6].

A huge role in the regulation of liver regeneration is attributed to macrophages, which is the subject of many studies [7]. Two types of models are usually used to study liver regeneration: after parenchyma resection and after toxic damage. The population of liver macrophages has been characterized in the most detail in the reparative process after toxic damage [8, 9]. It has been shown that monocytes migrate to the liver during toxic damage, and both migrating monocytes and macrophages formed from them and resident macrophages (Kupffer cells) are necessary for reparative processes [8, 9].

Data on the role of macrophages of medullary origin in mammalian liver regeneration after resection are contradictory [10]. Some studies indicate the absence of migration of medullary macrophages in the liver after removal of part of the parenchyma [11–13], while others show such a possibility [14, 15].

The aim of this work was to quantify the intensity of monocyte migration, proliferation and cell death of resident liver macrophages after its 70 % resection in a mouse model.

Materials and methods

Animals

Male mice of the BalbC line, weight 20–22 g, obtained from the «Stolbovaya» animal nursery (Chekhov, Moscow region, Russia) were used. The animals were kept in standard vivarium conditions. The conditions of laboratory animals were in accordance with the «International recommendations for conducting biomedical research using animals» of 1985, the rules of laboratory practice (Order of the Ministry of Health of Russian Federation 16.06.2003 № . 267), the Geneva Convention «International Guiding Principals for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990), as well as the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental or Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Experimental model

In mice (n = 76), a 70 % resection was performed under general isoflurane anesthesia according to the method of Higgins and Anderson [16]. The surgery was performed from 10.00 p.m. to 11.00 p.m. Animals

were removed from the experiment after 0h, 24h, 72h and 7 days. Intact (n = 25) as well as falsely operated animals (n = 27) were used as controls. The study was approved by the bioethics commission of the FGBNU Research Institute of Human Morphology (Protocol no. 3, dated 01.02.2019).

Kupffer cell isolation

Kupffer cells were isolated on a MidiMACS™ Separator magnetic sorter using LS Columns (Miltenyi Biotec, Germany) and Anti-F4/80 MicroBeadsUltraPure magnetic microparticles (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Flow cytometry analysis

The isolated macrophages were prepared for staining using InsideStainKit (Miltenyi Biotec, Germany). The antibodies used and the corresponding serotypic controls are summarized in Table 1. Antibodies were selected to assess the purity of the cells obtained by cell sorting — pan-macrophage marker F4/80 (cell adhesion protein) was used, as well as monocytic (bone marrow origin) macrophage markers — CD11b (integrin alpha-M involved in adhesion and endocytosis), Ly6C — a protein thought to be essential for monocyte migration. The analysis was performed on a Cytomics FC 500 cytometer (BeckmanCoulter, USA).

Table 1

Antibodies for flow cytometry

Antibodies	Isotypic control	Isotypic control
CD11b-VioBright FITC, mouse (clone: REA592)	REA Control-VioBright FITC	Miltenyi Biotec
Ly-6C-PE, mouse	Rat IgG2a-PE	Miltenyi Biotec
Anti-F4/80-PerCP-Vio700, mouse	REA Control-PerCP-Vio700	Miltenyi Biotec
Ki67-PE, anti-human/mouse, REAfinity™	REA Control Antibody (I), human IgG1, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec

Proliferative activity of macrophages

Proliferation activity was determined using Ki67 marker. Appropriate antibodies and isotypic control for flow cytometry are listed in Table 1.

Cell death activity

The level of cell death was examined by flow cytometry using the ANNEXIN V — FITC Kit — Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter, USA).

Western blot analysis

The amount of protein was determined by Western blotting according to the previously described method [11]. Proteins were isolated using MicroRotoforCellLysiskit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Proteins were transferred to membranes using Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini LF PVDF TransferKit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Membranes were stained with first antibodies at a dilution of 1:100 (Abcam, UK). Then with second antibodies conjugated to horseradish peroxidase Immun-StarGoatAnti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The stained membranes were analyzed using ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Statistical analysis

The results were analysed in SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., USA), using ranked one-factor analysis of variance with post-hoc analysis. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Immunophenotype of macrophages of regenerating liver

The phenotype of isolated macrophages from both intact and resected liver was studied, and it was found that 88.6 ± 6.2 % of cells carried the F4/80+ marker, approximately 4.7 ± 0.96 % of cells expressed Ly6C, 5.4 ± 1.0 % of cells were CD11b+(Fig.1 A, B). These results indicate that under normal conditions, the mouse liver macrophage population is represented almost exclusively by resident macrophages, Kupffer cells.

Liver resection markedly affected the immunophenotype of its macrophages. The greatest changes concerned the cells expressing CD11b and Ly6C. The number of Ly6C+ cells in the liver significantly increased 1 day after resection (11.7 ± 1.2 %) and increased up to 7 days after the operation (22.25 ± 1.3 %). Similar dynamics was observed in CD11b+ cells: there was a sharp increase by 3 days after resection (74.5 ± 1.1 %), by 7 days the number of CD11b+ cells decreased, but remained above the control value (Fig.1 A, B). The participation of

macrophages in regeneration is a highly conserved cellular mechanism of reparative processes, which is indicated by comparative studies conducted on representatives of several classes of vertebrates [4, 17].

As a rule, many macrophages of monocytic (medullary) origin migrate to the damaged organ during regeneration [4]. However, under normal conditions, the mammalian liver contains the most numerous population of macrophages, including those leading their origin from erythro-myeloid precursors of the yolk sac wall. At the same time, different authors in the study of liver regeneration have used markers that are expressed to a greater or lesser extent by both resident macrophages and those of bone marrow origin [14], or markers that are present not only in monocytes but also in other cells of the myeloid lineage [15]. In this regard, for a long time, due to the lack of specific markers reflecting the origin of macrophages, it was problematic to reliably estimate the extent of macrophage migration to the liver.

A great number of studies on mammalian liver regeneration have been performed on the model of 70 % liver resection. Due to the absence of a pronounced alteration phase in such damage, the question of the participation of macrophages of medullary origin in liver regeneration after resection remains debatable and poorly studied [11–14].

Based on the dynamics of Ly6C+ cells established in our study, we can conclude that a large number of monocytes/macrophages of medullary origin migrate into the regenerating liver after 70 % resection. The findings are in general agreement with those of Nishiyama et al. (2015), in which bone marrow-derived macrophages were detected using the marker CD11b [14]. At the same time, we found that the proportion of CD11b+ cells out of the total number of isolated F4/80+ cells on the 3rd day after resection reached 70 %, which exceeds the number of Ly6C+macrophages on the 3rd day. One of the reasons for this phenomenon may be the change in the level of CD11b expression in resident liver macrophages under the influence of LPS [14,19]. The migration of granulocytes (eosinophils and neutrophils) into the regenerating liver together with monocytes/macrophages of bone origin cannot be excluded, which is important for mammalian liver regeneration [19].

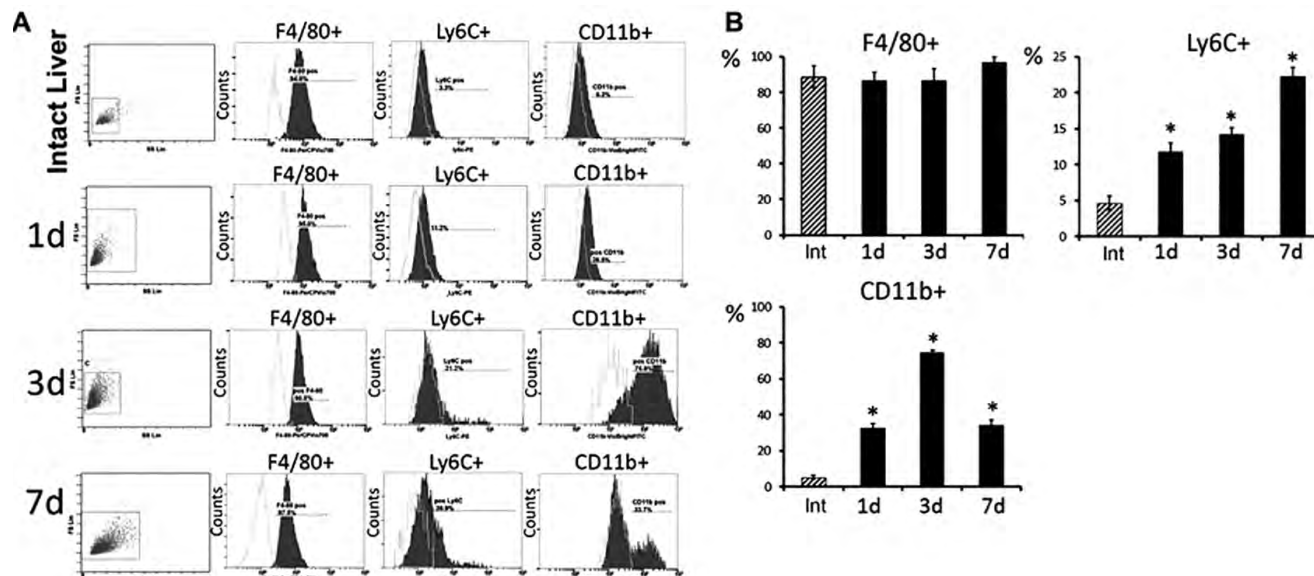


Fig. 1. Immunophenotype of macrophages in the regenerating liver according to flow cytometry. The abscissa axis shows the timing of liver regeneration (days); the ordinate axis shows the proportion of macrophages expressing the marker under study (%). Data are presented as mean values \pm standard deviation, * – $p < 0.05$ statistically significant differences relative to intact control (Int)

Proliferation dynamics

When studying the level of proliferation dynamics using Ki 67 marker in the liver after 70 % resection it was found that statistically significant increase of Ki67+ macrophages was observed 1 day after resection, the highest value of this index was reached 3 days after the operation ($36,9 \pm 5,9$ %), significantly increased number of Ki67+ macrophages remained till 7 days after the operation (Fig. 2 A). At the same time, the content of Cyclin D1 protein in macrophages of regenerating liver did not change, and the level of Cyclin E protein was statistically significantly increased 7 days after liver resection (Fig. 2B).

In addition to migration, the number of macrophages in the reparative process depends on the level of their proliferation and cell death. The model of Th2-inflammation of the peritoneum caused by the nematode *Litomosoides sigmodontis* invasion is an example of the extreme expression of the proliferation contribution to the increase in the number of macrophages [20]. In the same study,

it was noted that even under physiologic normal conditions, a significant proportion of resident peritoneal macrophages are in the mitotic cycle [20]. Macrophage proliferation plays a significant role in reparative processes in the liver as well. On the model of mice liver damage by paracetamol it was also established that exactly resident macrophages were characterized by the expressed proliferative ability in comparison with monocyte-derived macrophages, and the peak of macrophage proliferation in the conditions of this model is noted on the 3rd day [8]. It is believed that in rats after 70 % resection the peak proliferation of resident macrophages is noted after 2 days [21], similar data were obtained in conditions of liver resection of more than 80 % [11]. It is known that in mice hepatocyte proliferation during liver regeneration after resection starts later compared to other laboratory animals [22]. Our data are in agreement with this: the peak of macrophage proliferation is observed on the 3rd day after liver resection [8].

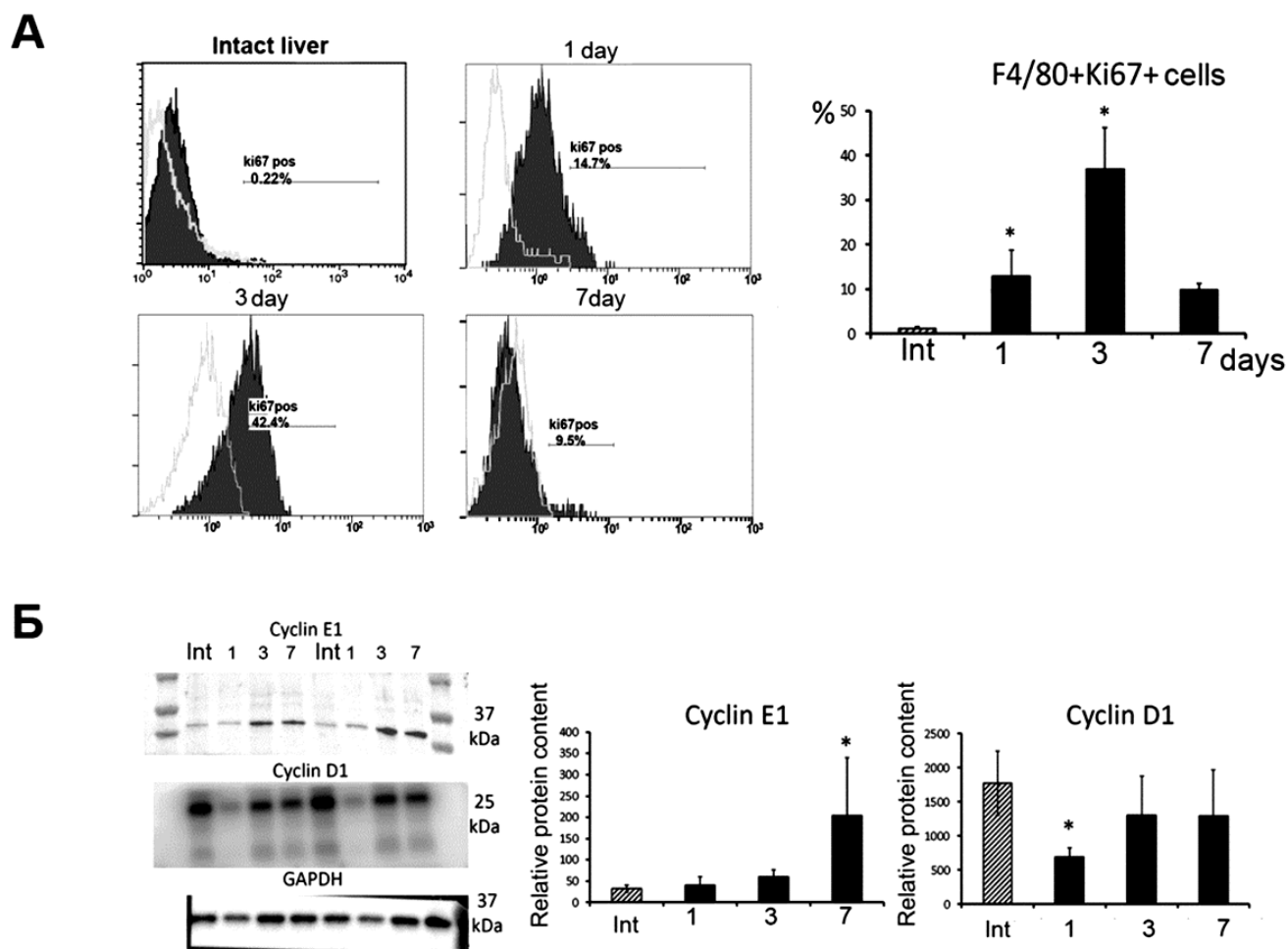


Fig. 2. Proliferation activity (A), relative content of factors regulating the proliferation of macrophages in the regenerating liver (B). On the abscissa axis is the timing of liver regeneration (days), on the ordinate axis is the proportion of macrophages expressing the marker under study (%) or the relative level of protein. Data are presented as mean values \pm standard deviation, * – $p < 0.05$ statistically significant differences relative to the intact liver (Int)

Cell death of macrophages of regenerating liver

Macrophages dying by apoptosis are found in the liver mainly only 1 day after surgery, the number of PI+ AnnexinV+ was about 11 %, and then sharply decreased (Fig. 3A). Meanwhile, a decrease in p53 protein levels in macrophages was observed after liver resection in mice (Fig. 3B).

The timing of the increase in the apoptosis activity of liver macrophages after 70 % resection is consistent with toxic models of liver injury [8], indicating, first of all, that it is the resident liver macrophages that die after liver resection.

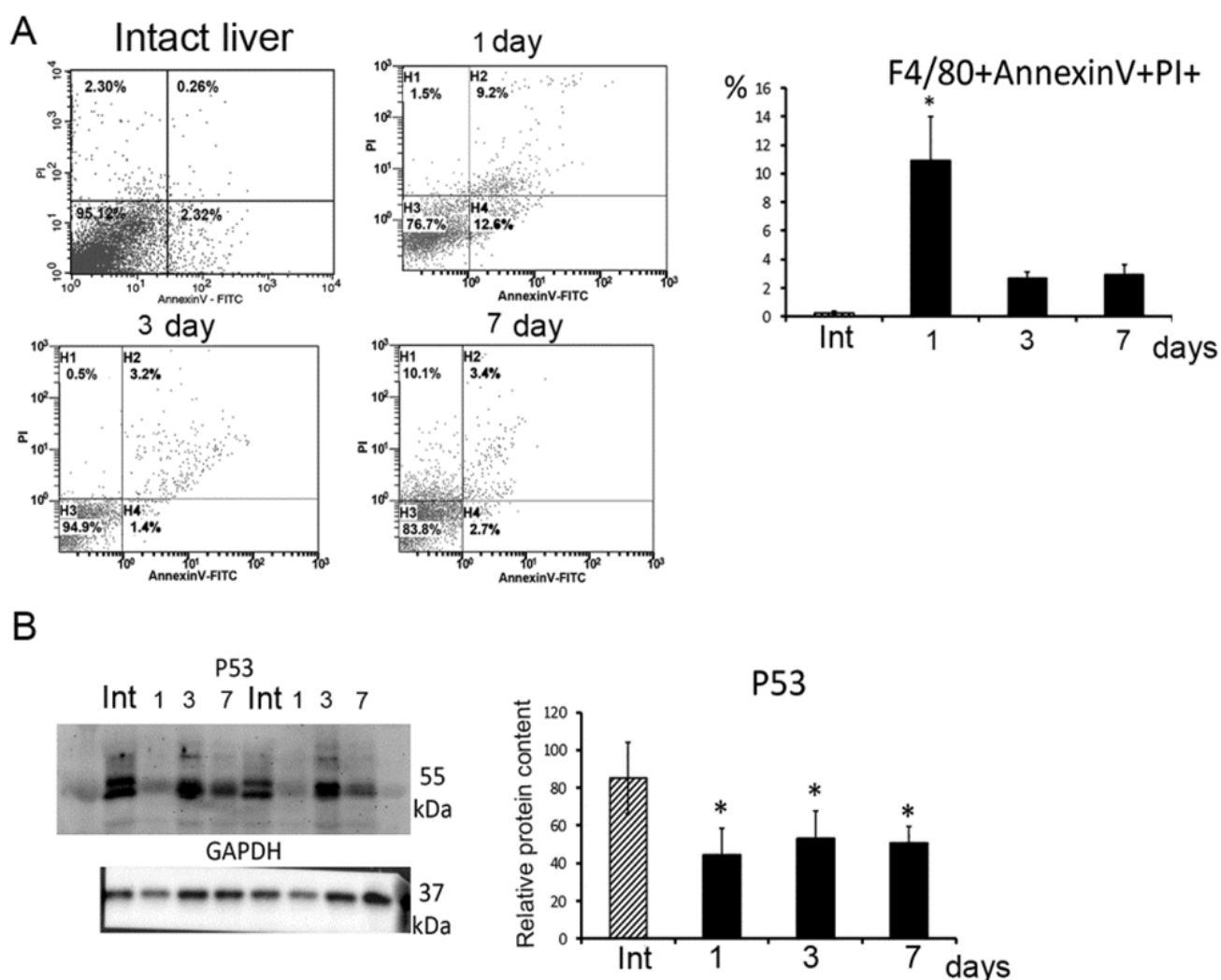


Fig. 3. Cell death activity (A), relative content of factors regulating cell death of macrophages in the regenerating liver (B). On the abscissa axis is the timing of liver regeneration (days), on the ordinate axis is the proportion of macrophages expressing the marker under study (%) or the relative level of protein. Data are presented as mean values \pm standard deviation, * – $p < 0.05$ statistically significant differences relative to the intact liver (Int)

Conclusion











The obtained data testify to the universality of the course of reparative processes in mammals regardless of their localization, as it was found that liver resection causes migration of Ly6C+CD11b+ monocytes into the damaged organ, activation of proliferation and death of resident macrophages. The loss of resident macrophages is restored by their proliferation.

References /Библиографический список

- Slack JM. Animal regeneration: ancestral character or evolutionary novelty? *EMBO Rep*. 2017;18(9):1497–1508. doi:10.15252/embr.201643795
- Brockes JP, Kumar A. Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24(1):525–549. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175336
- Muneoka K, Dawson LA. Evolution of epimorphosis in mammals. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. Published online January 17, 2020: jez.b.22925. doi:10.1002/jez.b.22925

4. Mescher AL, Neff AW, King MW. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Dev Comp Immunol.* 2017;66:98–110. doi:10.1016/j.dci.2016.02.015
5. Iismaa SE, Kaidonis X, Nicks AM, Bogush N, Kikuchi K, Naqvi N, Harvey R, Husain A, Graham R. Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. *npj Regen Med.* 2018;3(1). doi:10.1038/s41536-018-0044-5
6. Bangru S, Kalsotra A. Cellular and molecular basis of liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;100:74–87. doi:10.1016/j.semcdb.2019.12.004
7. Elchaninov AV, Fatkhudinov TK, Vishnyakova PA, Lokhonina AV, Sukhikh GT. Phenotypical and Functional Polymorphism of Liver Resident Macrophages. *Cells.* 2019;8(9). doi:10.3390/cells8091032
8. Zigmund E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, Varol C. Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *J Immunol.* 2014;193(1):344–353. doi:10.4049/jimmunol.1400574
9. You Q, Holt M, Yin H, Li G, Hu CJ, Ju C. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(6):836–843. doi:10.1016/j.bcp.2013.07.006
10. Michalopoulos GK. Advances in liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;8(8):897–907. doi:10.1586/17474124.2014.934358
11. Elchaninov AV, Fatkhudinov TK, Usman NY, Kananykhina EY, Arutyunyan IV, Makarov AV, Lokhonina AV, Eremina IZ, Surovtsev VV, Goldshtein DV, Bolshakova GB, Glinkina VV, Sukhikh GT. Dynamics of macrophage populations of the liver after subtotal hepatectomy in rats. *BMC Immunol.* 2018;19(1):23. doi:10.1186/s12865-018-0260-1
12. Song Z, Humar B, Gupta A, Maurizio E, Borgeaud N, Graf R, Clavien PA, Tian Y. Exogenous melatonin protects small-for-size liver grafts by promoting monocyte infiltration and releases interleukin-6. *J Pineal Res.* 2018;65(1): e12486. doi:10.1111/jpi.12486
13. Michalopoulos GK. Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(2):173–179. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.014
14. Nishiyama K, Nakashima H, Ikarashi M, Kinoshita M, Nakashima M, Aosasa S, Seki S, Yamamoto J. Mouse CD11b+Kupffer cells recruited from bone marrow accelerate liver regeneration after partial hepatectomy. *PLoS One.* 2015;10(9):1–16. doi:10.1371/journal.pone.0136774
15. Danilova IG, Yushkov BG, Kazakova IA, Belousova A V., Minin AS, Abidov MT. Recruitment of macrophages and bone marrow stem cells to regenerating liver promoted by sodium phthalhydrazide in mice. *Biomed Pharmacother.* 2019;110:594–601. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.086
16. Nevzorova Y, Tolba R, Trautwein C, Liedtke C. Partial hepatectomy in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1_suppl):81–88. doi:10.1177/0023677215572000
17. Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(5):517–527. doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.009
18. Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Seki S. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol.* 2010;53(5):903–910. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.037
19. Goh YP, Henderson NC, Heredia JE, Red Eagle A, Odegaard JI, Lehwald N, Nguyen KD, Sheppard D, Mukundan L, Locksley RM, Chawla A. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(24): 9914–9919. doi: 10.1073/pnas.1304046110
20. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation. *Science.* 2011;332(6035):1284–1288. doi: 10.1126/science.1204351
21. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science.* 1997;276(5309):60–66. doi: 10.1126/science.276.5309.60
22. Zou Y, Bao Q, Kumar S, Hu M, Wang GY, Dai G. Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration. *PLoS One.* 2012;7(2): e30675. doi: 10.1371/journal.pone.0030675

Миграция, пролиферация и клеточная гибель макрофагов регенерирующей печени в экспериментальной модели


М.В. Гринберг¹ , А.В. Лохонина² , П.А. Вишнякова² , А.В. Макаров³ , Е.Ю. Кананыхина⁴ ,
И.З. Еремина¹ , В.В. Глинкина³ , А.В. Ельчанинов⁴  , Т.Х. Фатхудинов⁴ 

¹ Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, г. Москва, Российская Федерация

³ Российский национальный исследовательский университет имени Н.И. Пирогова, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация

 elchandrey@yandex.ru

Аннотация. Актуальность. Макрофаги — ведущий клеточный дифферон, принимающий участие в регуляции репаративных процессов у млекопитающих, не является исключением и печень. Соотношение миграции моноцитов, пролиферации и гибели макрофагов при регенерации печени требует дальнейших исследований. Цель исследова-

ния — количественно оценить интенсивность миграции моноцитов, клеточного размножения и апоптоза резидентных макрофагов печени после ее 70 % резекции на модели у мыши. *Материалы и методы.* Выполняли 70 % резекцию печени у половозрелых самцов мышей линии Balb C. Клетки моноцитарно-макрофагальной системы печени получали с помощью магнитного сортирования по маркеру F4/80. Далее изучали иммунофенотип выделенных клеток с помощью цитофлуориметрии, уровень пролиферации и клеточной гибели, содержание циклинов и P53 определяли методом вестерн-блот. *Результаты и обсуждение.* Установлено, что после частичной гепатэктомии наблюдается выраженная миграция моноцитов/макрофагов положительных по маркерам Ly6C и CD11b в печень, процесс миграции начинается уже в первые сутки после операции. На этих же сроках отмечается подъем пролиферативной активности макрофагов, установленный с помощью маркера Ki67, пик пролиферации — 3 сутки после частичной гепатэктомии. В ранние сроки после резекции печени обнаружено значимое увеличение числа гибнущих макрофагов. *Выводы.* Полученные данные свидетельствуют о том, что регенерация печени у млекопитающих на модели у мышей сопровождается миграцией, пролиферацией и клеточной гибелью макрофагов. Учитывая иммунофенотип макрофагов, можно заключить, что в печень мигрируют Ly6C+ моноциты крови, а в пролиферации участвуют резидентные макрофаги. Полученные данные подтверждают универсальность течения репаративных процессов у млекопитающих.

Ключевые слова: печень, регенерация, макрофаги, миграция, пролиферация, апоптоз

Информация о финансировании: работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № 121040600436–7, гранта РФФИ 22–14–00152

Вклад авторов: М.В. Гринберг, Е.Ю. Кананыхина, И.З. Еремина, А.В. Ельчанинов — проведение экспериментов с животными, А.В. Лохонина, А.В. Макаров, И.В. Арутюнян — иммуногистохимическое исследование, А.В. Ельчанинов, П.А. Вишнякова, В.В. Глинкина, Т.Х. Фатхудинов — концепция и дизайн исследования, В.В. Глинкина, А.В. Ельчанинов — редактирование рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Этическое утверждение — Исследование одобрено комиссией по биоэтике ФГБНУ НИИ морфологии человека (Протокол № . 3, от 01.02.2019).

Благодарности — неприменимо.

Информационное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 15.10.2023. Принята 14.11.2023.

Для цитирования: Grinberg M.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Kananykhina E.Yu., Eremina I.Z., Glinkina V.V., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh. Migration, proliferation and cell death of regenerating liver macrophages in an experimental model // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. 449–458. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–449–458

Corresponding author: Elchaninov Andrey Vladimirovich — PhD, MD, Associate Professor, Head of the Laboratory of Growth and Development of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky National Research Centre of Surgery», 117418, Tsyurupa Street 3, Moscow, Russian Federation. E-mail: elchandrey@yandex.ru
Grinber M.V. ORCID 0000–0002–9159–4232
Vishnyakova P.A. ORCID 0000–0001–8650–8240
Lokhonina A.V. ORCID 0000–0001–8077–2307
Makarov A.V. ORCID 0000–0003–2133–2293

Kananykhina E. Yu. ORCID 0000–0002–9779–2918
Eremina I.Z. ORCID 0000–0001–5444–9231
Glinkina V.V. ORCID 0000–0001–8708–6940
Elchaninov A.V. ORCID 0000–0002–2392–4439
Fatkhudinov T. Kh. ORCID 0000–0002–6498–5764

Ответственный за переписку: Ельчанинов Андрей Владимирович — доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией роста и развития «Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Российская Федерация, 117418, Москва, улица Цюрупы, д. 3, E-mail: elchandrey@yandex.ru

Гринберг М.В. SPIN 6260–1863; ORCID 0000–0002–9159–4232
Лохонина А.В. SPIN 4521–2250; ORCID 0000–0001–8077–2307
Вишнякова П.А. SPIN 3406–3866; ORCID 0000–0001–8650–8240
Макаров А.В. SPIN 3534–3764; ORCID 0000–0003–2133–2293
Кананыхина Е.Ю. SPIN 8256–5754; ORCID 0000–0002–9779–2918
Еремина И.З. SPIN 5819–6159; ORCID 0000–0001–5444–9231
Глинкина В.В. SPIN 4425–5052; ORCID 0000–0001–8708–6940
Ельчанинов А.В. SPIN 5160–9029; ORCID 0000–0002–2392–4439
Фатхудинов Т.Х. SPIN 7919–8430; ORCID 0000–0002–6498–5764



DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-459-469

EDN: ITZWHG


REVIEW
ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas

Mariia S. Tretyakova^{1,2}  , Ustinya A. Bokova^{1,2} ,
Anastasia A. Korobeynikova^{1,2} , Evgeny V. Denisov^{1,2} 

¹ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University, Moscow, Russian Federation

² Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

 treymar@mail.ru

Abstract. Soft tissue sarcomas are rare tumors (about 1 % of all malignant neoplasms) and include more than 70 histological subtypes, the pathogenetic features of which remain unclear. This is largely due to both quantity and volume of clinical material and high heterogeneity of the disease. Given the rarity and heterogeneity of each individual subtype of soft tissue sarcoma, there is an urgent need to develop universal model systems to understand the molecular changes that determine tumor biology. Such systems include CDX models (cell line-derived xenograft), created from cell lines, PDX (patient-derived xenograft), obtained from primary tumor/metastasis cells, both a whole fragment of surgical material and from a cell suspension; humanized animals containing various human immune cells, and GEM (genetically engineered mouse) models, which are created through transfection of genetic changes characteristic of different subtypes of soft tissue sarcomas. To create these systems, not only widely available mouse models are used, but also other animals, such as fish (*Danio rerio*), rats, pigs, and dogs. Another important goal of using animal models is to screen the effectiveness of modern drugs. To date, treatment of various subtypes of soft tissue sarcomas is based on standard protocols of chemotherapy (doxorubicin, epirubicin, dacarbazine, ifosfamide) and surgical resection. In the case of inoperable forms or late stages of soft tissue sarcomas, animal models are a potential tool in predicting the effectiveness of therapy and personalized selection of treatment regimens. In this regard, studies of the mechanisms of targeted action on specific molecules and the use of humanized animals for the development of new approaches to immunotherapy are of particular relevance. The current review discusses animal model systems of the three most common types of soft tissue sarcomas: liposarcomas, undifferentiated pleomorphic and synovial sarcomas, as well as the use of these models to find new therapeutic solutions. **Conclusion.** Currently, PDX and GEM models are widely used to identify molecules and signaling pathways involved in the development of sarcomas, identify tumor-initiating cells, and assess the chemoresistance of known drugs and new drugs at the level of the entire tumor ecosystem. However, the key problems of animal models of soft tissue sarcomas remain changes in their composition and phenotype compared to the original tumor, poor survival of surgical material, and lack of cellular immunity in immunocompetent models, high cost, and the length of time it takes to create and maintain the model. A solution to one of the problems may be the use of humanized animals with PDX, which implies the presence in the model of immune, stromal and tumor components that are as close as possible to the human body.

Keywords: soft tissue sarcomas, *in vivo* models, therapy

© Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Denisov E.V., 2023



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation (grant 23–65–00003).

Author contributions. All authors have made significant contributions to the concepts, manuscript preparation, read and approved final version before publication.

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

Acknowledgements — not applicable.

Ethics approval — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 12.10.2023. Accepted 14.11.2023.

For citation: Tretyakova MS, Bokova UA, Korobeynikova AA, Denisov EV. Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):459–469. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–459–469

Introduction

Sarcoma is a rare tissue disease of mesenchymal origin that forms in bones, adipose tissue, joints and muscles and is divided into two main groups: soft tissue sarcomas (STS) (more than 70 types) and bone sarcomas (osteosarcoma, chondrosarcoma and Ewing sarcoma) [1]. The biology of sarcomas remains poorly understood due to high heterogeneity, different origins and histology, but a common feature is a poor prognosis in patients with advanced disease [2].

Given the rarity of each individual subtype of STS and the heterogeneity of the disease, there is an urgent need to develop model systems to understand the molecular changes that determine tumor biology, diagnosis, prognosis and the effectiveness of disease therapy. However, the limited number of model systems available in oncology makes the selection of suitable models even more challenging. Well-known mouse models are successfully used in preclinical studies of new therapeutic agents and selection of therapy for various oncological diseases [3–9]. Therefore, it is advisable to use these models to study various subtypes of sarcomas as well. In addition to the widely available mouse models, other animals, such as *Danio rerio* fish, rats, pigs and dogs, can serve as platforms for testing hypotheses about genetic factors contributing to the initiation and/or progression of cancer and, to

a sufficient extent, reflect intertumor heterogeneity [10–13]. Thus, despite high heterogeneity and low incidence of STS, in recent decades various biological systems have been developed to model the disease in order to identify pathogenetically significant signaling pathways, mutations and markers and to develop new methods of antitumor therapy.

STS *in vivo* models

Information on the population composition of STS is mainly obtained from *in vitro* studies [14, 15], which use various cell lines: primary, immortalized and 3D cultures [16–18]. However, it is well known that when cells adapt to artificial culture conditions, they proliferate faster than parental tumor cells, acquiring new phenotypic characteristics that change their characteristics and therapeutic response [14]. Therefore, it is more expedient to study tumor cells biology and evaluate treatment effectiveness in a living organism.

Modeling a tumor disease *in vivo* involves methods of engrafting tumor cells into laboratory animals. Such models are divided into 2 types: «cell line-derived xenograft» (CDX) — a xenograft obtained from a cell line, and «patient-derived xenograft» (PDX) — a model obtained from primary tumor/metastasis cells. Both models are representative and predictive for basic and

translational research [19, 20]. Although CDX is still the most commonly used model due to its wide availability and ease of use, PDX is the most effective in terms of translational potential.

Another approach to modeling sarcomas *in vivo*, when tumor cell transplantation is not necessary, is to induce *de novo* sarcomagenesis in immunocompetent mice. Such environmentally induced (EIM) and genetically engineered mouse (GEM) models are applicable to specific subtypes of STS, but their development is complex and time-consuming. EIM models are obtained by exposure to various physical factors (for example, intramuscular injection of cardiotoxin and barium chloride), while GEM models are created through transfection of genetic changes characteristic of sarcomas [21, 22]. These model systems have made it possible to expand knowledge about oncogenic, tumor suppressor and other signaling pathways associated with the development of sarcomas.

Experimental models of liposarcomas

Liposarcomas are tumors of adipose tissue and are divided into several subtypes, among which the common ones are well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. The diagnosis of each subtype is based on anatomical location, clinical presentation and histology, and is characterized by a distinctive set of genetic features [23, 24]. However, well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma may represent the same subtype, since both are associated with amplification in the chromosomal region 12q13–15, which causes overexpression of the *MDM2* and *CDK4* genes [25].

A well-differentiated liposarcoma has a low incidence of metastasis and indolent course and can be considered a low-grade tumor, while other subtypes of liposarcoma demonstrate a high metastatic potential [25]. Liposarcomas vary in location, but most often they are observed in the retroperitoneum. This pattern facilitates modeling *in vivo*, since the introduction of tumor cells into the abdominal cavity is a routine method for obtaining intraperitoneal tumors [26].

Typically, when modeling liposarcomas from the primary tumor, samples are dissociated into a homogeneous cell suspension for the purpose

of injection into immunocompromised mice [27]. The immunocompetent mouse model (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) has a weakened immune system and is considered the most effective for xenotransplantation. The tumor suspension can be administered subcutaneously (ectopic xenograft) or into a specific organ (heterotopic model). Several cases of obtaining PDX models have been described, including for selecting individual treatment for patients with liposarcoma. The development of such models usually takes a long time, up to six months, and up to 75 % of implanted tumors successfully assimilate in animal organisms [28]. PDX models of liposarcomas make it possible to select personalized therapy, achieving high efficiency [28]. In addition, there are works where CDX models of liposarcomas were used to test the effectiveness of doxorubicin and cisplatin to predict therapeutic response in cancer patients [25].

However, the limited number of suitable animal systems, high heterogeneity and low incidence of liposarcomas are the main obstacles to obtaining highly effective *in vivo* models of this disease.

Experimental models of undifferentiated pleomorphic sarcomas

Undifferentiated pleomorphic sarcomas are the most common type and are classified as tumors of indeterminate differentiation, predominantly located in the upper and lower extremities of the body [29]. Surgical intervention leading to disability remains the only radical treatment method for this category of patients due to low incidence of subtypes of undifferentiated pleomorphic sarcoma and lack of large clinical trials. However, disorders of the *TP53*, *RB1*, *PTEN*, *CDKN2A* and *ATRX* genes have been described as associated with the development of this type of sarcoma and can be considered potential therapeutic targets [30–32].

The development of animal models of undifferentiated pleomorphic sarcomas is complicated by problems with the availability and quantity of clinical material [33]. However, in recent decades, primary undifferentiated pleomorphic sarcoma cell

lines and corresponding ectopic mouse models have been obtained [34, 35]. These model systems allowed establishing differences in the effectiveness of doxorubicin *in vivo* and *in vitro*, thereby emphasizing the need to test chemotherapeutic agents not only in cell lines, but also in laboratory animals [34].

Another study showed that models of undifferentiated pleomorphic sarcoma obtained in immunodeficient mice from primary lines were similar in histological characteristics and protein expression of Ki-67 and CD31 to patients' tumor tissues [36]. However, the clonal composition of tumors *in vivo* and patients, as well as their transcriptomic features were different, which caused differences in the effectiveness of doxorubicin, gemcitabine and cisplatin [36].

In addition to the use of tumor cells and primary cell lines, there are examples of subcutaneous implantation of an intact tumor fragment and the formation of viable xenografts that are similar to the original tumors in terms of the content of necrotic cells [37]. Such models are easily reproducible, in contrast to injection of a cell suspension of the primary tumor.

GEM models with pathogenetically significant molecular abnormalities make it possible to evaluate the growth and development of tumors under natural conditions in the body of an experimental animal. For instance, a model of undifferentiated pleomorphic sarcoma using GEM (red fluorescent protein, RFP+) and the introduction of a surgical tumor fragment has become a platform for non-invasive imaging of tumor growth, migration, cell invasion and screening of drug efficacy [38]. A mouse model of undifferentiated pleomorphic sarcoma has also been obtained using the Cre-loxP and CRISPR-Cas9 genome editing systems. The introduction of adenoviral vectors led to the spontaneous formation of tumors similar in histology, morphology and mutational profile [39]. The development of such models is less expensive both time and money-wise compared to traditional GEM models.

Thus, experimental models of undifferentiated pleomorphic sarcoma, mainly GEM, have allowed the development of new therapeutic strategies, including organ-preserving treatments to improve the quality of life of patients.

Experimental models of synovial sarcoma

Synovial sarcoma accounts for 5 % to 10 % of all STS, is characterized by aggressive growth and is associated with the t(X,18) chromosomal translocation encoding the chimeric *SS18-SSX* gene [40, 41]. Although some synovial sarcomas develop near joints, the tumor cells are morphologically dissimilar to the synovium, and the tumor precursor cell remains unknown to date [42]. Surgical resection with or without radiation and/or doxorubicin-based chemotherapy is the mainstay of treatment for patients with synovial sarcoma [43]. The insufficiency of treatment options justifies the relevance of studying the molecular mechanisms of this type of sarcoma and developing new therapeutic solutions.

Major studies of the pathogenesis of synovial sarcoma, like most other tumors, are based on the analysis of cell lines, primary tumor cells and xenografts. A CDX model of synovial sarcoma has been developed using the SW-982 cell line, which is similar to the primary tumor in histological and immunohistochemical terms [44]. There are PDX models of synovial sarcoma, including those used to test the effectiveness of new treatment methods [45–47]. Recently developed GEM models have significantly expanded the scope of preclinical studies of synovial sarcoma (Fig.). Although labor-intensive and expensive, GEM models based on site-specific recombination technology are fundamental tools for understanding the pathogenesis and molecular biology of cancer [48]. Thus, it has been shown that high expression of the chimeric gene *SYT-SSX2* is associated with the development of synovial sarcoma, and myoblasts are potential precursors of tumor cells [49, 50]. In another GEM model, after injection of the TAT-CRE protein (Cre-loxP genetic engineering system), the role of *PTEN* gene alterations in enhancing tumor growth and metastasis of synovial sarcoma was proven [51], which is associated with low patient survival rates [52]. However, despite these advances, the high heterogeneity of synovial sarcoma is the main obstacle to the creation of a universal model system (Fig.).

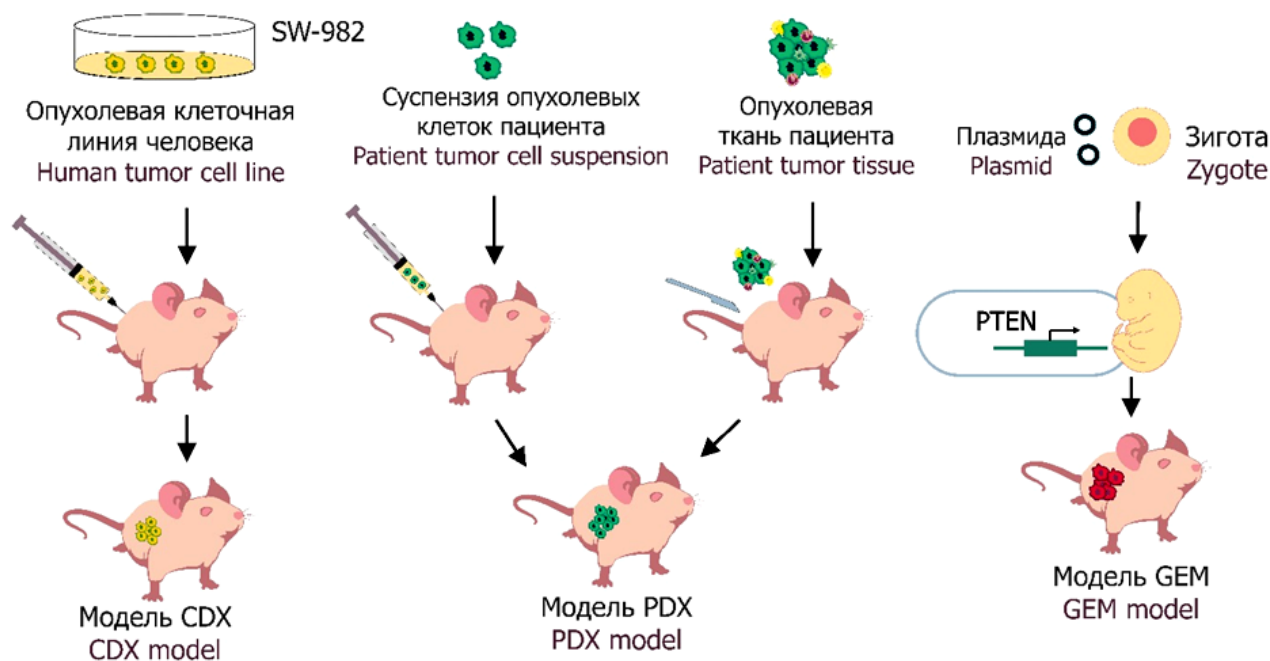


Fig. Different methods for modeling synovial sarcoma *in vivo*

Application of *in vivo* models in therapy

One of the primary objectives of animal models is to screen for the effectiveness of drugs. To date, treatment of various subtypes of STS is based on standard protocols of chemotherapy (doxorubicin, epirubicin, dacarbazine, ifosfamide), a combination of anthracyclines with ifosfamide and/or dacarbazine, and surgical resection [53, 54].

Through *in vivo* models, drug efficacy is screened and new therapeutic approaches are actively developed. Among such approaches, targeted drugs occupy a special place. PDX models of undifferentiated pleomorphic sarcoma allow testing potential agents aimed at different targets, as the xenograft mimics the disease pattern, including invasive growth into surrounding tissues, metastasis, and relapse formation after surgery [55]. The targeted drug temozolomide demonstrated high efficacy in orthotopic PDX models of undifferentiated pleomorphic sarcoma. The combination of gemcitabine/docetaxel and pazopanib was effective in three of the orthotopic PDX

models. At the same time, the sensitivity of each subtype of undifferentiated pleomorphic sarcoma to drugs was individual for each of the models. In other words, each subtype of sarcoma was characterized by its own pattern of drug sensitivity [56, 57].

An orthotopic PDX model, derived from a primary tumor in athymic nude mice and mimicking doxorubicin resistance, has also been developed for dedifferentiated liposarcoma. This model shows that metabolic exposure to recombinant methioninase (rMETase) in combination with palbociclib (a CDK4 inhibitor) leads to tumor regression [57]. In addition, in synovial sarcoma, palbociclib inhibits Rb phosphorylation, causing cell cycle arrest in the G1 phase and blocking proliferation. Targeting synovial sarcoma at molecular level is especially relevant, since, unlike most sarcomas that recur and metastasize to lymph nodes, synovial sarcomas are characterized by early distant metastasis to the lungs [58]. For instance, in models of synovial sarcoma, it has been shown that deficiency of INI-1 (integrase

interactor 1) causes the EZH2 protein (enhancer of zeste homolog 2) to acquire oncogenic driver properties and the ability to specifically bind to the chimeric gene *SS18-SSX1* [47]. Thus, targeting EZH2, for example with the drug tazemetostat, is effective in treating patients with synovial sarcoma and other types of cancer [47, 59].

The development of advanced humanized animal models is necessary to study the cellular and molecular factors involved in the immune antitumor response and to develop new immunotherapeutic tools [60]. One of the main directions in immunotherapy is the blockade of immune checkpoints for programmed cell death: PD-1 (programmed cell death protein 1) and PD-L1 (programmed cell death ligand 1) [61]. Dedifferentiated liposarcoma xenografted NOD mice treated with pembrolizumab (anti-PD-1) demonstrated immune cell infiltration and subsequent tumor regression [60]. Pembrolizumab was also effective in clinical trials in the treatment of synovial sarcoma, DDL and undifferentiated pleomorphic sarcoma [62]. Another example of immunotherapy for synovial sarcoma is the use of ipilimumab, which targets the NY-ESO-1 protein (CTAG1B, cancer/testis antigen 1B) [63]. However, the immunological features of the microenvironment of various types of STS remain poorly understood, and further studies, including *in vivo* models, will identify new immunotherapeutic targets.

When discussing the development of new approaches to STS treatment, one cannot ignore physical methods of influencing the tumor. One of them is the ablation method, a non-invasive option based on high-intensity focused ultrasound that allows tissue to be destroyed thermally or mechanically into an acellular homogenate [64]. The safety and effectiveness of one ablative method (histotripsy) for the removal of superficial STS tumors has been demonstrated in large animal models including cats and dogs [64, 65]. Treatment and subsequent tumor resection showed that histotripsy was well tolerated and very effective in dogs with spontaneous STS. It is assumed that histotripsy, in addition to physical destruction, can change the tumor microenvironment, releasing tumor antigens and leading to tumor infiltration by immune cells, thereby causing a local and systemic immune response [65]. Another

method is cryoablation, where the pain is reduced through the use of low temperatures [66].

Despite the wide capabilities of *in vivo* models, they have serious disadvantages, including difficulty of obtaining, high cost, and the impossibility of recreating the structure and cellular composition of the original tumor. The latter likely explains the discrepancies in drug efficacy obtained between *in vivo* models and patients. For example, the drug olaratumab (a monoclonal antibody against PDGF receptor alpha) showed antitumor activity in PDX models, but was low effective in clinical trials for metastatic sarcoma [67, 68].

Thus, studies of therapeutic approaches in *in vivo* models expand the possibilities for finding new methods of treating aggressive and heterogeneous forms of STS. Given the low effectiveness of monochemotherapy in cases of inoperable forms or late stages of STS, animal models are a potential tool in predicting the effectiveness of therapy and selecting other treatment methods.

Conclusion

Various animal models are indispensable tools in oncology, allowing for research to identify the molecular and cellular mechanisms of the formation and progression of malignancies, identify targets, develop drugs and therapeutic tools and test their effectiveness. Especially, these models are relevant for STS, characterized by high aggressiveness and heterogeneity, as well as low frequency of occurrence, which complicates the collection of a representative amount of clinical material. Currently, PDX and GEM models are widely used to identify molecules and signaling pathways involved in the development of sarcomas, identify tumor-initiating cells, and assess the chemoresistance of known drugs and new drugs at the level of the entire tumor ecosystem. However, the key problems of STS animal models remain changes in their composition and phenotype compared to the original tumor, poor survival of surgical material, lack of cellular immunity in immunocompetent models, high cost, and the length of time it takes to create and maintain the model. A solution to one of the problems

may be the use of humanized animals with PDX, which implies the presence in the model of immune, stromal and tumor components that are as close as possible to the human body. However, developing such models is an even more expensive and time-consuming task.






References/ Библиографический список

- Dodd RD, Mito JK, Kirsch DG. Animal models of soft-tissue sarcoma. *Dis Model Mech*. 2010;3(9–10):557–66. doi:10.1242/dmm.005223
- Birdi HK, Jirovec A, Cortés-Kaplan S, Werier J, Nessim C, Diallo JS, Ardolino M. Immunotherapy for sarcomas: new frontiers and unveiled opportunities. *J Immunother Cancer*. 2021;9(2). doi:10.1136/jitc-2020-001580
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(6):338–50. doi:10.1038/nrclinonc.2012.61
- Zhou Y, Tozzi F, Chen J, Fan F, Xia L, Wang J, Gao G, Zhang A, Xia X, Brasher H, Widger W, Ellis LM, Weihua Z. Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2012;72(1):304–14. doi:10.1158/0008-5472.can-11-1674
- Choi SYC, Ribeiro CF, Wang Y, Loda M, Plymate SR, Uo T. Druggable Metabolic Vulnerabilities Are Exposed and Masked during Progression to Castration Resistant Prostate Cancer. *Biomolecules*. 2022;12(11):1590. doi:10.3390/biom12111590
- Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, Sailer V, Augello M, Puca L, Rosati R, McNary TJ, Churakova Y, Cheung C, Triscott J, Pisapia D, Rao R, Mosquera JM, Robinson B, Faltas BM, Emerling BE, Gadi VK, Bernard B, Elemento O, Beltran H, Demichelis F, Kemp CJ, Grandori C, Cantley LC, Rubin MA. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discovery*. 2017;7(5):462–477. doi:10.1158/2159-8290.cd-16-1154
- Chen J, Liao S, Xiao Z, Pan Q, Wang X, Shen K, Wang S, Yang L, Guo F, Liu HF, Pan Q. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. *Front Immunol*. 2022;13:1007579. doi:10.3389/fimmu.2022.1007579
- Jung HY, Kim TH, Lee JE, Kim HK, Cho JH, Choi YS, Shin S, Lee SH, Rhee H, Lee HK, Choi HJ, Jang HY, Lee S, Kang JH, Choi YA, Lee S, Lee J, Choi Y, Kim J. PDX models of human lung squamous cell carcinoma: consideration of factors in preclinical and co-clinical applications. *J Transl Med*. 2020;18(1):307. doi:10.1186/s12967-020-02473-y
- Katsiampoura A, Raghav K, Jiang ZQ, Menter DG, Varkaris A, Morelli MP, Manuel S, Wu J, Sorokin AV, Rizi BS, Bristow C, Tian F, Airhart S, Cheng M, Broom BM, Morris J, Overman MJ, Powis G, Kopetz S. Modeling of Patient-Derived Xenografts in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(7):1435–1442. doi:10.1158/1535-7163.mct-16-0721
- White R, Rose K, Zon L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(9):624–36. doi:10.1038/nrc3589
- Bao Y, Hua B, Hou W, Shi Z, Li W, Li C, Chen C, Liu R, Qin Y. Involvement of Protease-Activated Receptor 2 in Nociceptive Behavior in a Rat Model of Bone Cancer. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014;52(4):566–576. doi:10.1007/s12031-013-0112-7
- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerds V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology*. 2012;20(1):50–57. doi:10.1016/j.tim.2011.11.002
- Brown DC, Agnello K, Iadarola MJ. Intrathecal resinerferatoxin in a dog model: efficacy in bone cancer pain. *Pain*. 2015;156(6):1018–1024. doi:10.1097/j.pain.0000000000000115
- Salawu A, Fernando M, Hughes D, Reed MW, Woll P, Greaves C, Day C, Alhajimohammed M, Sisley K. Establishment and molecular characterisation of seven novel soft-tissue sarcoma cell lines. *Br J Cancer*. 2016;115(9):1058–1068. doi:10.1038/bjc.2016.259
- Muff R, Botter SM, Husmann K, Tchinda J, Selvam P, Seeli-Maduz F, Fuchs B. Explant culture of sarcoma patients' tissue. *Laboratory Investigation*. 2016;96(7):752–762. doi:10.1038/labinvest.2016.49
- Cree IA, Glaysher S, Harvey AL. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):375–9. doi:10.1016/j.coph.2010.05.001
- Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, Cimmino A, de Nigris F. Sarcoma Spheroids and Organoids-Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2). doi:10.3390/ijms19020615
- Wakamatsu T, Ogawa H, Yoshida K, Matsuoka Y, Shizuma K, Imura Y, Tamiya H, Nakai S, Yagi T, Nagata S, Yui Y, Sasagawa S, Takenaka S. Establishment of Organoids From Human Epithelioid Sarcoma With the Air-Liquid Interface Organoid Cultures. *Frontiers in Oncology*. 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.893592
- Imle R, Kommos FKF, Banito A. Preclinical In Vivo Modeling of Pediatric Sarcoma-Promises and Limitations. *J Clin Med*. 2021;10(8). doi:10.3390/jcm10081578
- Langenau DM, Sweet-Cordero A, Wechsler-Reya RJ, Dyer MA. Preclinical Models Provide Scientific Justification and Translational Relevance for Moving Novel Therapeutics into Clinical Trials for Pediatric Cancer. *Cancer Research*. 2015; 75(24):5176–5186. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1308
- Camboni M, Hammond S, Martin LT, Martin PT. Induction of a regenerative microenvironment in skeletal muscle is sufficient to induce embryonal rhabdomyosarcoma in p53-deficient mice. *J Pathol*. 2012;226(1):40–9. doi:10.1002/path.2996
- DuPage M, Jacks T. Genetically engineered mouse models of cancer reveal new insights about the antitumor immune response. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):192–9. doi:10.1016/j.coi.2013.02.005
- Bill KL, Casadei L, Prudner BC, Iwenofu H, Strohecker AM, Pollock RE. Liposarcoma: molecular targets and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(19):3711–8. doi:10.1007/s00018-016-2266-2
- Thway K. Well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma: An updated review. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(2):112–121. doi:10.1053/j.semdp.2019.02.006
- Codenotti S, Mansoury W, Pinardi L, Monti E, Marampon F, Fanzani A. Animal models of well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma: utility and limitations. *Onco Targets Ther*. 2019;12:5257–5268. doi:10.2147/ott.s175710


26. Xie Fa, Qin D, Lian L, Li M, Kong X, Xia X, Huang L, Chen J, Yu C, Luo C, Li W. Establishment of a New Orthotopic Perirenal-Space-Grafted Mouse Model of Retroperitoneal Sarcoma. Book Establishment of a New Orthotopic Perirenal-Space-Grafted Mouse Model of Retroperitoneal Sarcoma. *EditorResearch Square*. 2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-89811/v1
27. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008;456(7222):593–598. doi:10.1038/nature07567
28. Stebbing J, Paz K, Schwartz GK, Wexler LH, Maki R, Pollock RE, Morris R, Cohen R, Shankar A, Blackman G, Harding V, Vasquez D, Krell J, Zacharoulis S, Ciznadija D, Katz A, Sidransky D. Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer*. 2014;120(13):2006–15. doi:10.1002/cncr.28696
29. Benites BM, Miranda-Silva W, Fonseca FP, Oliveira C, Fregnani ER. Undifferentiated pleomorphic sarcoma of the mandible. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2020;46(4):282–287. doi:10.5125/jkaoms.2020.46.4.282
30. Steele CD, Tarabichi M, Oukrif D, Webster AP, Ye H, Fittall M, Lombard P, Martincorena I, Tarpey PS, Collord G, Haase K, Strauss SJ, Berisha F, Vaikkinen H, Dhami P, Jansen M, Behjati S, Amary MF, Tirabosco R, Feber A, Campbell PJ, Alexandrov LB, Van Loo P, Flanagan AM, Pillay N. Undifferentiated Sarcomas Develop through Distinct Evolutionary Pathways. *Cancer Cell*. 2019;35(3):441–456. e8. doi:10.1016/j.ccell.2019.02.002
31. Kim J, Kim JH, Kang HG, Park SY, Yu JY, Lee EY, Oh SE, Kim YH, Yun T, Park C, Cho SY, You HJ. Integrated molecular characterization of adult soft tissue sarcoma for therapeutic targets. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):216. doi:10.1186/s12881-018-0722-6
32. Bui NQ, Przybyl J, Trabucco SE, Frampton G, Hastie T, van de Rijn M, Ganjoo KN. A clinico-genomic analysis of soft tissue sarcoma patients reveals CDKN2A deletion as a biomarker for poor prognosis. *Clin Sarcoma Res*. 2019;9:12. doi:10.1186/s13569-019-0122-5
33. Bhalla AD, Landers SM, Singh AK, Landry JP, Yeagley MG, Myerson GSB, Delgado-Baez CB, Dunnand S, Nguyen T, Ma X, Bolshakov S, Menegaz BA, Lamhamedi-Cherradi S-E, Mao X, Song X, Lazar AJ, McCutcheon IE, Slopis JM, Ludwig JA, Lev DC, Rai K, Torres KE. Experimental models of undifferentiated pleomorphic sarcoma and malignant peripheral nerve sheath tumor. *Laboratory Investigation*. 2022;102(6):658–666. doi:10.1038/s41374-022-00734-6
34. Becker M, Graf C, Tonak M, Radsak MP, Bopp T, Bals R, Bohle RM, Theobald M, Rommens PM, Proschek D, Wehler TC. Xenograft models for undifferentiated pleomorphic sarcoma not otherwise specified are essential for preclinical testing of therapeutic agents. *Oncol Lett*. 2016;12(2):1257–1264. doi:10.3892/ol.2016.4784
35. Nishio J, Iwasaki H, Nabeshima K, Ishiguro M, Isayama T, Naito M. Establishment of a new human pleomorphic malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-2: molecular cytogenetic characterization by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2010;29(1):153. doi:10.1186/1756-9966-29-153
36. Lee EY, Kim YH, Rayhan MA, Kang HG, Kim JH, Park JW, Park SY, Lee SH, You HJ. New established cell lines from undifferentiated pleomorphic sarcoma for in vivo study. *BMB Rep*. 2023;56(4):258–264. doi:10.5483/BMBRep.2022-0209
37. Tilkorn DJ, Stricker I, Hauser J, Ring A, Schmitz I, Steinstraesser L, Steinau HU, Daigeler A, Al-Benna S. Experimental murine model of primary high grade undifferentiated pleomorphic sarcoma not otherwise specified. *In Vivo*. 2012;26(4): P. 559–63
38. Kiyuna T, Murakami T, Tome Y, Igarashi K, Kawaguchi K, Russell T, Eckardt MA, Crompton J, Singh A, Bernthal N, Bukata S, Federman N, Kanaya F, Eilber FC, Hoffman RM. Labeling the Stroma of a Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Mouse Model of Undifferentiated Pleomorphic Soft-Tissue Sarcoma With Red Fluorescent Protein for Rapid Non-Invasive Imaging for Drug Screening. *J Cell Biochem*. 2017;118(2):361–365. doi:10.1002/jcb.25643
39. Huang J, Chen M, Whitley MJ, Kuo H-C, Xu ES, Walens A, Mowery YM, Van Mater D, Eward WC, Cardona DM, Luo L, Ma Y, Lopez OM, Nelson CE, Robinson-Hamm JN, Reddy A, Dave SS, Gersbach CA, Dodd RD, Kirsch DG. Generation and comparison of CRISPR-Cas9 and Cre-mediated genetically engineered mouse models of sarcoma. *Nature Communications*. 2017;8(1):15999. doi:10.1038/ncomms15999
40. Barrott JJ, Kafchinski LA, Jin H, Potter JW, Kannan SD, Kennedy R, Mosbrugger T, Wang W-L, Tsai J-W, Araujo DM, Liu T, Capecchi MR, Lazar AJ, Jones KB. Modeling synovial sarcoma metastasis in the mouse: PI3'-lipid signaling and inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(13):2989–3005. doi:10.1084/jem.20160817
41. Nielsen TO, Poulin NM, Ladanyi M. Synovial Sarcoma: Recent Discoveries as a Roadmap to New Avenues for Therapy. *Cancer Discovery*. 2015;5(2):124–134. doi:10.1158/2159-8290.cd-14-1246
42. El Beaino M, Araujo DM, Lazar AJ, Lin PP. Synovial Sarcoma: Advances in Diagnosis and Treatment Identification of New Biologic Targets to Improve Multimodal Therapy. *Annals of Surgical Oncology*. 2017;24(8):2145–2154. doi:10.1245/s10434-017-5855-x
43. Haldar M, Randall RL, Capecchi MR. Synovial sarcoma: from genetics to genetic-based animal modeling. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(9):2156–67. doi:10.1007/s11999-008-0340-2
44. Steinstraesser L, Hauk J, Jacobsen F, Stricker I, Steinau HU, Al-Benna S. Establishment of a synovial sarcoma model in athymic nude mice. *In Vivo*. 2011;25 (2):165–9
45. Cornillie J, Wozniak A, Li H, Wang Y, Boeckx B, Gebreyohannes YK, Wellens J, Vanleeuw U, Hompes D, Stas M, Sinnave F, Wafa H, Lambrechts D, Debiec-Rychter M, Sciot R, Schöffski P. Establishment and Characterization of Histologically and Molecularly Stable Soft-tissue Sarcoma Xenograft Models for Biological Studies and Preclinical Drug Testing. *Mol Cancer Ther*. 2019;18 (6):1168–1178. doi:10.1158/1535-7163.mct-18-1045
46. Isfort I, Cyra M, Elges S, Kailayangiri S, Altvater B, Rossig C, Steinestel K, Grünwald I, Huss S, Eßeling E, Mikesch JH, Hafner S, Simmet T, Wozniak A, Schöffski P, Larsson O, Wardelmann E, Trautmann M, Hartmann W. SS18-SSX-Dependent YAP/TAZ Signaling in Synovial Sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25 (12):3718–3731. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-3553
47. Kawano S, Grassian AR, Tsuda M, Knutson SK, Warholic NM, Kuznetsov G, Xu S, Xiao Y, Pollock RM, Smith JS, Kuntz KK, Ribich S, Minoshima Y, Matsui J, Copeland RA, Tanaka S, Keilhack H. Preclinical Evidence of Anti-Tumor Activity Induced by EZH2 Inhibition in Human Models of Synovial Sarcoma. *PLoS One*. 2016;11(7): e0158888. doi:10.1371/journal.pone.0158888

48. Xu H, Zheng H, Zhang Q, Song H, Wang Q, Xiao J, Dong Y, Shen Z, Wang S, Wu S, Wei Y, Lu W, Zhu Y, Niu X. A Multicentre Clinical Study of Sarcoma Personalised Treatment Using Patient-Derived Tumour Xenografts. *Clinical Oncology*. 2023;35(1): e48-e59. doi:10.1016/j.clon.2022.06.002
49. Haldar M, Hedberg ML, Hockin MF, Capecchi MR. A CreER-based random induction strategy for modeling translocation-associated sarcomas in mice. *Cancer Res*. 2009;69(8):3657–64. doi:10.1158/0008-5472.can-08-4127
50. Haldar M, Hancock JD, Coffin CM, Lessnick SL, Capecchi MR. A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. *Cancer Cell*. 2007;11(4):375–88. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.016
51. Landuzzi L, Ruzzi F, Lollini PL, Scotlandi K. Synovial Sarcoma Preclinical Modeling: Integrating Transgenic Mouse Models and Patient-Derived Models for Translational Research. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3). doi:10.3390/cancers15030588
52. Teng HW, Wang HW, Chen WM, Chao TC, Hsieh YY, Hsieh CH, Tzeng CH, Chen PC, Yen CC. Prevalence and prognostic influence of genomic changes of EGFR pathway markers in synovial sarcoma. *J Surg Oncol*. 2011;103(8):773–81. doi:10.1002/jso.21852
53. Higuchi T, Kawaguchi K, Miyake K, Oshiro H, Zhang Z, Razmjooei S, Wangsiricharoen S, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Nelson SD, Dry SM, Li Y, Chawla SP, Eilber FC, Singh SR, Tsuchiya H, Hoffman RM. The combination of gemcitabine and nab-paclitaxel as a novel effective treatment strategy for undifferentiated soft-tissue sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;111:835–840. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.110
54. Italiano A, Mathoulin-Pelissier S, Cesne AL, Terrier P, Bonvalot S, Collin F, Michels JJ, Blay JY, Coindre JM, Bui B. Trends in survival for patients with metastatic soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2011;117(5):1049–1054. doi:10.1002/cncr.25538
55. Igarashi K, Kawaguchi K, Murakami T, Miyake K, Kiyuna T, Miyake M, Hiroshima Y, Higuchi T, Oshiro H, Nelson SD. Patient-derived orthotopic xenograft models of sarcoma. *Cancer Letters*. 2020;469:332–339. doi:10.3389/fonc.2022.957844
56. Kawaguchi K, Igarashi K, Miyake K, Kiyuna T, Miyake M, Singh AS, Chmielowski B, Nelson SD, Russell TA, Dry SM. Patterns of sensitivity to a panel of drugs are highly individualised for undifferentiated/unclassified soft tissue sarcoma (USTS) in patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse models. *Journal of Drug Targeting*. 2019;27(2):211–216.
57. Igarashi K, Kawaguchi K, Kiyuna T, Miyake K, Miyaki M, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Higuchi T, Singh AS, Chmielowski B, Nelson SD, Russell TA, Eckardt MA, Dry SM, Li Y, Singh SR, Chawla SP, Eilber FC, Tsuchiya H, Hoffman RM. Metabolic targeting with recombinant methioninase combined with palbociclib regresses a doxorubicin-resistant dedifferentiated liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;506(4):912–917. doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.119
58. Scheer M, Blank B, Bauer S, Vokuhl C, Stegmaier S, Feuchtgruber S, Henssen A, Sparber-Sauer M, Eggert A, Handgretinger R. Synovial sarcoma disease characteristics and primary tumor sites differ between patient age groups: a report of the Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS). *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2020;146:953–960. doi:10.1007/s00432-019-03121-9
59. Zeng J, Zhang J, Sun Y, Wang J, Ren C, Banerjee S, Ouyang L, Wang Y. Targeting EZH2 for cancer therapy: From current progress to novel strategies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;238:114419. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114419
60. Choi B, Lee JS, Kim SJ, Hong D, Park JB, Lee K-Y. Anti-tumor effects of anti-PD-1 antibody, pembrolizumab, in humanized NSG PDX mice xenografted with dedifferentiated liposarcoma. *Cancer letters*. 2020;478:56–69. doi:10.1016/j.canlet.2020.02.042
61. Zhong Y, Ma Z, Wang F, Wang X, Yang Y, Liu Y, Zhao X, Li J, Du H, Zhang M. In vivo molecular imaging for immunotherapy using ultra-bright near-infrared-IIb rare-earth nanoparticles. *Nature biotechnology*. 2019;37(11):1322–1331. doi:10.1038/s41587-019-0262-4
62. Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, Van Tine BA, Schuetz SM, Hu J, D'Angelo S, Attia S, Riedel RF, Priebat DA, Movva S, Davis LE, Okuno SH, Reed DR, Crowley J, Butterfield LH, Salazar R, Rodriguez-Canales J, Lazar AJ, Wistuba II, Baker LH, Maki RG, Reinke D, Patel S. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1493–1501. doi:10.1016/s1470-2045(17)30624-1
63. Lee A, Huang P, DeMatteo RP, Pollack SM. Immunotherapy for soft tissue sarcoma: tomorrow is only a day away. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2016;36:281–290. doi:10.1200/EDBK_157439
64. Ruger L, Yang E, Coutermarsh-Ott S, Vickers E, Gannon J, Nightengale M, Hsueh A, Ciepluch B, Dervisis N, Vlaisavljevich E. Histotripsy ablation for the treatment of feline injection site sarcomas: a first-in-cat in vivo feasibility study. *International Journal of Hyperthermia*. 2023;40(1):2210272. doi:10.1080/02656736.2023.2210272
65. Ruger L, Yang E, Gannon J, Sheppard H, Coutermarsh-Ott S, Ziemlewicz TJ, Dervisis N, Allen IC, Daniel GB, Tuohy J. Mechanical high-intensity focused ultrasound (histotripsy) in dogs with spontaneously occurring soft tissue sarcomas. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2022;70(3):768–779. doi:10.1109/TBME.2022.3201709
66. Papalexis N, Savarese LG, Peta G, Errani C, Tuzzato G, Spinnato P, Ponti F, Miceli M, Facchini G. The New Ice Age of Musculoskeletal Intervention: Role of Percutaneous Cryoablation in Bone and Soft Tissue Tumors. *Current Oncology*. 2023;30(7):6744–6770. doi:10.3390/currenocol30070495
67. Tap WD, Jones RL, Van Tine BA, Chmielowski B, Elias AD, Adkins D, Agulnik M, Cooney MM, Livingston MB, Pennock G. Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial. *The Lancet*. 2016;388(10043):488–497. doi:10.1016/S0140-6736(16)30587-6
68. Tap WD, Wagner AJ, Schöffski P, Martin-Broto J, Krarup-Hansen A, Ganjoo KN, Yen C-C, Razak ARA, Spira A, Kawai A. Effect of doxorubicin plus olaratumab vs doxorubicin plus placebo on survival in patients with advanced soft tissue sarcomas: the ANNOUNCE randomized clinical trial. *Jama*. 2020;323(13):1266–1276. doi:10.1001/jama.2020.1707

Экспериментальные модели опухолевого роста при саркомах мягких тканей

М.С. Третьякова^{1,2}  , У.А. Бокова^{1,2} ,
А.А. Коробейникова^{1,2} , Е.В. Денисов^{1,2} 

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, г. Томск, Российская Федерация
 trreemar@mail.ru

Аннотация. Саркомы мягких тканей представляют собой редкие опухоли (около 1 % от всех злокачественных новообразований) и включают более 70 гистологических подтипов, патогенетические особенности которых остаются до конца невыясненными. Во многом это связано как с количеством и объемом клинического материала, так и с высокой гетерогенностью заболевания. Учитывая редкость каждого отдельного подтипа сарком мягких тканей и гетерогенность, остро стоит вопрос о необходимости разработки универсальных модельных систем для понимания молекулярных изменений, определяющих биологию опухоли. К таким системам относят CDX-модели (cell line-derived xenograft), созданные из клеточных линий, PDX (patient-derived xenograft), полученные из клеток первичной опухоли/метастаза как целого фрагмента операционного материала, так и из клеточной суспензии; гуманизированные животные, содержащие различные человеческие иммунные клетки, и GEM (генно-модифицированные модели), которые создаются посредством трансфекции генетических изменений, характерных для различных подтипов сарком мягких тканей. Для создания тест систем используются не только широкодоступные мышинные модели, но и другие животные, такие как рыбы *Danio rerio*, крысы, свиньи и собаки. Другой важной задачей применения животных моделей является скрининг эффективности современных лекарственных препаратов. На сегодняшний день лечение различных подтипов сарком мягких тканей основано на стандартных протоколах химиотерапии (доксорубин, эпирубин, дакарбазин, ифосфамид) и хирургической резекции. В случае неоперабельных форм или поздних стадий сарком мягких тканей животные модели являются потенциальным инструментом в предсказании эффективности терапии и персонализированного подбора схем лечения. В этом плане особую актуальность представляют исследования механизмов таргетного воздействия на специфические молекулярные мишени и применение гуманизированных животных для разработки новых подходов иммунотерапии. В данном обзоре обсуждаются животные модельные системы трех наиболее распространенных типов сарком мягких тканей: липосарком, недифференцированных плеоморфных и синовиальных сарком, а также применение данных моделей для поиска новых терапевтических решений. **Выводы.** В настоящее время находят широкое применение PDX и GEM модели, позволяющие идентифицировать молекулы и сигнальные пути, вовлеченные в развитие сарком, выявлять опухоль-инициирующие клетки, оценивать химиорезистентность известных препаратов и новых лекарственных средств на уровне целостной опухолевой экосистемы. Тем не менее, ключевыми проблемами животных моделей саркомы мягких тканей остаются изменение их состава и фенотипа по сравнению с исходной опухолью, плохая приживаемость операционного материала, отсутствие клеточного иммунитета в иммунокомпетентных моделях, дороговизна, длительность создания и поддержания модели. Решением одной из проблем может стать использование гуманизированных животных с PDX, что подразумевает наличие в модели иммунного, стромального и опухолевого компонентов, максимально приближенных к человеческому организму.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей, *in vivo* модели, терапия

Информация о финансировании. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23–65–00003)

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

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

Благодарности — не применимо.

Этическое утверждение — не применимо.

Информированное согласие на публикацию — не применимо.

Поступила 16.10.2023. Принята 14.11.2023.

Для цитирования: *Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Denisov E.V.* Experimental models of tumor growth in soft tissue sarcomas // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 459–469. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–459–469

Corresponding author: Maria S. Tretyakova — junior researcher of Laboratory of Cancer Progression Biology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, 634009, Kooperativny Street, 5, Tomsk, Russian Federation. E-mail: treemar@mail.ru.

Tretyakova M.S. ORCID 0000–0002–5040–931X

Bokova U.A. ORCID 0000–0003–2179–5685

Korobeynikova A.A. ORCID 0000–0002–2633–9884

Denisov E.V. ORCID 0000–0003–2923–9755

Ответственный за переписку: Третьякова Мария Сергеевна — м. н. с. лаборатории биологии опухолевой прогрессии Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Российская Федерация, 634009, пер. Кооперативный, 5. E-mail: treemar@mail.ru.

Третьякова М.С. SPIN 5207–8330; ORCID 0000–0002–5040–931X

Бокова У.А. SPIN 3546–0527; ORCID 0000–0003–2179–5685

Коробейникова А.А. SPIN 5523–8156; ORCID 0000–0002–2633–9884

Денисов Е.В. SPIN 9498–5797; ORCID 0000–0003–2923–9755



IMMUNOLOGY ИММУНОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-470-482
EDN: IUGAPQ

ORIGINAL RESEARCH
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ


Mechanisms of Regulation Allergic and Autoimmune Reactions by Bacterial Origin Bioregulators

Svetlana V. Guryanova^{1,2}  , Ilya A. Sigmatulin³ , Olga O. Gigani² , Sofia A. Lipkina³

¹ M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

² RUDN University, Moscow, Russian Federation

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

 svgur@mail.ru

Abstract: Relevance. The increase in allergic and autoimmune diseases observed in recent decades highlights the need for therapy and prevention, which requires detailed research into the mechanisms of their occurrence. The onset and progression of allergic and autoimmune diseases are influenced by genetic predisposition, lifestyle, environmental factors, and disruptions in the coordinated operation of the immune system, and as a consequence of immune homeostasis. Treatment of these diseases is primarily symptomatic and often accompanied by undesirable side effects. Immune system disorders in various pathologies have their own characteristics for each type of disease, and at the same time have common mechanisms. Considering the presence of a large number of various microorganisms in the human body, taking their influence into account is of paramount importance. Microorganisms are a source of biologically active molecules, the action of which can either prevent and reduce the severity of the disease or exacerbate it. *The aim* of this study was to analyze the cytokine profile of the effects of fragments of cell walls of Gram-negative and Gram-positive bacteria — lipopolysaccharide (LPS) and muramyl peptide (MP), as well as nisin — an antimicrobial peptide of bacterial origin on human mononuclear cells. *Materials and Methods.* Mononuclear cells were obtained from peripheral blood of healthy volunteers using Cell separation media Lympholyte CL 5015, and were cultured in the presence of LPS, GMDP and bacteriocin nisin. The cytokine activity of LPS, GMDP and bacteriocin nisin was examined using the multiplex cytokine analysis; the analysis of surface markers was determined flow cytometry. *Results and Discussion.* It was shown that bacterial cell wall fragments to a much greater extent than nisin induce the production of cytokines, chemokines, and growth factors. It was established that LPS and MP increase the expression of CD11c on dendritic cells, while bacteriocin nisin does not affect the increase of CD11c+ DCs. LPS and MP in the conducted *ex vivo* studies did not affect the emergence of CCR7.

© Guryanova S.V., Sigmatulin I.A., Gigani O.O., Lipkina S.A., 2023



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

Conclusion. Bacterial origin bioregulators trigger a negative feedback mechanism by inducing the synthesis of anti-inflammatory factors, that can prevent the inflammatory process. Understanding the molecular mechanisms of the influence of bacterial origin bioregulators on the human body opens new approaches in the prevention and development of personalized therapy strategies.

Keywords: innate immunity, immune homeostasis, allergy, autoimmunity, tolerance, LPS, lipopolysaccharide, glucosaminylmuramyl dipeptide, muramyl peptide, nisin, inflammation regulation, bacterial origin bioregulators

Funding: This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Author Contributions: Conceptualization — S.V. Guryanova; methodology — S.V. Guryanova; validation — S.V. Guryanova; investigation, formal analysis S.A. Lipkina, I.A. Sigmatulin, O.O. Gigani; S.V. Guryanova; writing — S.V. Guryanova, S.A. Lipkina, I.A. Sigmatulin, O.O. Gigani. All authors have read and agreed to the final version of the manuscript.

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

Acknowledgments — not applicable.

Ethics approval. The study protocol was approved by Ethics Committee of the RUDN University.

Consent for publication — not applicable. Voluntary written informed consent was obtained from all subjects involved in the study with an agreement to take part in the study, personal data processing and publishing this paper.

Received 04.09.2023. Accepted 03.10.2023.

For citation: Guryanova SV, Sigmatulin IA, Gigani OO, Lipkina SA. Mechanisms of regulation allergic and autoimmune reactions by bacterial origin bioregulators. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):470–482. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–470–482

Introduction

Allergic and autoimmune diseases represent two main categories of immune disorders affecting a significant number of people worldwide. These diseases are characterized by abnormal immune responses, but differ in their mechanisms and impact on the body [1, 2]. Allergic and autoimmune diseases have reached epidemic proportions and currently affect more than one billion people [3].

Allergic diseases are characterized by the immune system's hyperreactivity to external allergens such as pollen, dust, animals, and certain foods. The most common forms of allergic diseases are asthma, atopic dermatitis (AD), allergic rhinitis, and food allergy [4]. Currently, 10 % of children suffer from food allergy, and 20–25 % of adults have at least one allergic disease [5, 6]. According to the 2019 Global Burden of Disease study, there were 262 million cases of asthma and 171

million cases of AD worldwide in 2019; the 3416 and 2277 per 100,000 population, respectively, for asthma and AD [7–9]. A sharp increase in prevalence has been noted in developed countries over the past few decades, and an increase in incidence is expected in developing countries [6].

Autoimmune diseases occur when the immune system mistakenly attacks the body's own cells and tissues. This includes diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, celiac disease, and many others [10]. The prevalence of autoimmune diseases is increasing and is estimated at 10.2 % based on the study of electronic medical records of more than 22 million people [11]. The annual growth of the overall morbidity and prevalence of autoimmune diseases worldwide is 19.1 % and 12.5 % respectively [12], with 63.9 % of these diagnosed individuals being women and 36.1 % men [11]. The

predominance of women with autoimmune diseases is also noted in other studies [10]. The mechanisms of autoimmune reactions are divided into two fundamental pathological processes — autoimmunity and autoinflammation, which can potentiate each other [13]. Autoimmunity is associated with the disruption of immunological tolerance to normal tissue proteins (autoantigens), is associated with the predominance of acquired (adaptive) immunity activation, and is manifested by hyperproduction of autoantibodies. Autoinflammation, in turn, is considered as a pathological process based on the genetically determined (or induced) activation of innate immunity [13–17].

Allergic and autoimmune diseases are of global significance, as they affect the health of millions of people. Each category has its unique challenges in the field of management and treatment. Allergic diseases most often require symptom management and prevention of allergen exposure, while autoimmune diseases often require a more complex approach to treatment, including suppression of the immune system and identification of underlying causes. Existing management and treatment strategies significantly improve the quality of life of patients, but often do not achieve the goal of long-term remission without appropriate therapy [18]. An important aspect of managing these diseases is early diagnosis, which allows for treatment to begin at the most effective time and minimizes the risk of long-term complications [19]. In the context of allergic diseases, key strategies include avoiding allergens and using medications such as antihistamines, corticosteroids, and inhalers to control symptoms [4, 20–22]. In some cases, immunotherapy aimed at reducing sensitivity to allergens may be recommended [1, 2]. In the case of autoimmune diseases, the treatment approach often includes immunosuppressive drugs to reduce immune system activity and inflammation [2]. Individual treatment plans may include the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), biological agents, and immune response modifiers, which can have local and systemic side effects [2, 23]. Side effects of antihistamines can include

drowsiness, blurred vision, dry mouth, constipation or difficulty urinating, headache, and fatigue. Nasal corticosteroids can include nose irritation, nosebleeds, headache, and sometimes perforation of the nasal septum with prolonged use. Long-term use of oral corticosteroids can cause side effects including weight gain, increased risk of infections, osteoporosis, increased blood pressure, and sleep disturbances. Decongestants used to relieve nasal congestion can cause insomnia, headache, increased blood pressure, and irritability. Immunotherapy (allergen-specific immunotherapy) can lead to allergic reactions, including skin reactions at the injection site, nasal congestion, throat itching, or, in rare cases, anaphylaxis. Side effects of biological drugs used to treat severe allergic diseases such as asthma can include headache, injection site reactions, increased risk of infections, renal failure, and slowed growth in children [24–28]. In severe cases, an anaphylactic reaction with serious consequences can develop [29].

Among the mechanisms and risk factors for the pathophysiology of allergic and autoimmune diseases, the presence of various and common factors is identified, including genetic, environmental factors, lifestyle, and response to the microbiome [3, 10, 30]. The microbiome is assigned a key role in the development and evolution of these diseases [3, 31]. A significant part of the human microbiome is concentrated in the gut, mostly in the colon and the proximal part of the small intestine [32, 33]. Bacteria residing in the gut are a source of biologically active substances, and they also help the host digest complex foods and synthesize necessary metabolites, such as vitamins B and K [34, 35]. Metabolites and bacterial components regulate the host's immune response by affecting the proliferation, migration, differentiation, and effector functions of immune cells and influence the development of allergic diseases [36, 37]. Key mechanisms of action of bacterial origin bioregulators (BOBs) affect their impact on humoral and cellular factors, modulating both links of immunity — innate and adaptive. BOBs modulate the reactivity of the immune system: they can stimulate the immune system to a higher or lower than normal response to

allergens. For example, lipopolysaccharide (LPS), the main component of the outer surface membrane of gram-negative bacteria [38], increases the level of inflammatory cytokines [39–41], which in turn can enhance allergic and autoimmune reactions [42, 43]. It is important to note the complex mechanism of regulation of inflammatory reactions by lipopolysaccharide: prolonged exposure to LPS induces the production of anti-inflammatory cytokines and transcription factors that limit inflammation [40, 44, 45]. Muramyl peptide (MP), a component of the cell walls of gram-positive bacteria, also has a dual effect; the primary impact of MP stimulates pro-inflammatory reactions, while with prolonged exposure MP generates anti-inflammatory factors [44]. Dysregulation of the adequate immune response to BOBs exacerbates the course of allergic and autoimmune diseases [46, 47].

Mechanisms of action of bacterial origin bioregulators can be carried out through corresponding receptors of innate immunity or directly, affecting cell membranes. For example, LPS exerts its activity through TLR4, muramyl peptides activate NLRs, while antimicrobial peptides produced by bacteria and called bacteriocins can have a nonspecific effect due to amphiphilicity and electrostatic interaction with the eukaryotic membranes [48–51]. Conflicting results of the effects of bacterial origin bioregulators require further research to accurately predict their effects and influence on the initiation and progression of allergic and autoimmune diseases. The aim of the current study was to determine the influence of LPS, MP, and bacteriocin nisin on humoral factors — cytokine production, as well as on the change in phenotype of dendritic cells, which take an active part in innate immunity and the formation of tolerance.

Materials and Methods

Isolation of mononuclear cells

Blood was collected with the written informed consent of healthy donors aged 20–22 years. The experiment protocol was approved by the University's Ethical Commission, N 21 from 11.10.2021. Peripheral

blood was collected in tubes (Vacuette, Greiner Bio-One, Austria) with anticoagulant (0.1 ml of 2.7 % EDTA solution; pH 7.2–7.4 per 1 ml of blood). Whole blood was diluted in a 1:3 ratio with phosphate-buffered saline (PBS, PanEco, Moscow, Russia), layered onto Cell separation media Lympholyte CL 5015 (Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada), and centrifuged for 40 min at 400 G. Mononuclear cells (MNCs) were washed twice (10 min; 1000 rpm) by centrifugation in excess PBS and resuspended in complete RPMI 1640 medium (Gibco, Waltham, MA, USA), containing 10 % fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10 mM Hepes buffer (pH 7.2) (PanEco, Moscow, Russia). Cell viability was determined by trypan blue staining.

Cultivation of human mononuclear cells in the presence of LPS, MP, and bacteriocin nisin to determine cytokine activity

Mononuclear cells were added to the wells of a 96-well round-bottom plate (Costar, Washington, WA, USA), at 0.2×10^6 per well, and glucosaminylmuramyl dipeptide (MP, GMDP) was added at a final concentration of 5 µg/ml, with lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/ml), bacteriocin nisin (1 ng/ml), and an equal volume of medium to control wells. Concentrations were determined by preceding experiments and corresponded to the maximum plateau values [52]. The plates were incubated for 4 hours at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere, the supernatant was collected, and cytokines were tested.

Multiplex cytokine analysis

Multiplex cytokine analysis was performed using magnetic beads with antibodies for the determination of human cytokines/chemokines using the Luminex 200, Merck (Millipore) equipment, and software (Burlington, Massachusetts, USA). For this purpose, supernatants of mononuclear cells, previously cultured with LPS, MP, nisin, and phosphate buffer as a control, were collected and analyzed according to the manufacturer's instructions. Assays included a bead-based fluorescence MILLIPIX® assay/Luminex fluorescence platform (LMX).

Cultivation of human blood cells in the presence of LPS, MP, and bacteriocin nisin to determine surface markers

Peripheral blood was collected in tubes (Vacuette, Greiner Bio-One, Austria) with anticoagulant (0.1 ml of 2.7 % EDTA solution; pH 7.2–7.4 per 1 ml of blood) and MP was added at a final concentration of 5 µg/ml, with LPS (1 µg/ml), bacteriocin nisin (1 ng/ml), and an equal volume of medium to control samples.

Flow cytometry

For the analysis of surface markers, blood samples were incubated with 2 µM of LPS, MP, and nisin for 1 h at +36 °C and then with specific antibodies for 1 h at +4 °C, washed, and measured on a CytoFLEX device (Beckman Coulter LS, Indianapolis, USA), data was analyzed by CytExpert software. Phenotyping was performed using markers HLA-DR PE-Cy5, CD11c APC, CD123 APC-eFluor780, CCR7 PE-Cy7 against CD3, CD20, CD56, CD14; CD80, CD83 markers. MDC populations were determined by HLADR+ CD3- CD14- CD20- CD56- CD11c+ CD123-, PDC was determined by markers HLA-DR+ CD3- CD14- CD20- CD56- CD11c + CD123+ FITC (BD Biosciences, USA).

Statistics

Statistical analysis was conducted using MS Excel software. Data are presented as the mean ± SEM of at least two independent experiments or as one representative experiment of two. For determining intergroup differences of independent samples and assessing their statistical significance with a normal distribution, an unpaired Student's t-test was applied. Significance levels of $p < 0.05$ were considered statistically reliable.

Results and Discussion

The influence of LPS, MP, and bacteriocin nisin on cytokine production

Allergic and autoimmune diseases develop as a result of an aberrant body reaction to harmless antigens or antigens of one's own tissues with direct regulation by cytokines and chemokines. The study of the influence

of LPS, MP, and bacteriocin nisin on the production of cytokines by mononuclear cells from healthy donors using a fluorescent method showed significant differences in their ability to stimulate the production of cytokines, chemokines, and growth factors. The analysis of the levels of production of cytokines, chemokines, and growth factors under the influence of bacterial origin bioregulators has established that muramylpeptide and lipopolysaccharide have the most active influence (Fig. 1).

LPS and MP increased almost all pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, chemokines and growth factors, with the exception of IL-13 and PDGF-AA, on which LPS had a slight effect.

Muramyl peptide increased all levels of the substances studied except for IL-13. Interestingly, LPS, MP, and bacteriocin nisin lowered the level of IL-13 by more than three orders of magnitude. IL-13 plays a critical role in the regulation of allergic reactions by participating in B cell maturation and IgE production. On the other hand, IL-13 can suppress macrophage activity, reducing inflammation and tissue damage.

Nisin showed the least pronounced activity in increasing the substances studied, PDGF-AA was decreased by half compared to the unstimulated sample. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA, -AB, and -BB has multiple functions including the ability to stimulate cell growth and proliferation. (PDGF)-AA, -AB, and -BB play a key role in angiogenesis and blood vessel formation, induce and differential chemotaxis of early-passage rat lung fibroblasts in vitro [53].

In the study, LPS and MP increased the production of IL-10 by 42 and 22 times, respectively, while nisin also increased its level, but to a much lesser extent; the increase was three times compared to the control value. Our results are consistent with the data of other researchers who noted an increase in IL-10 under the influence of nisin in experimental animal models [54, 55]. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that regulates the balance of the immune response in maintaining immune homeostasis. IL-10 reduces the expression of Th1, Th17 cytokines, and together with MHC class II antigens and costimulatory molecules on macrophages, may also suppress the activity of

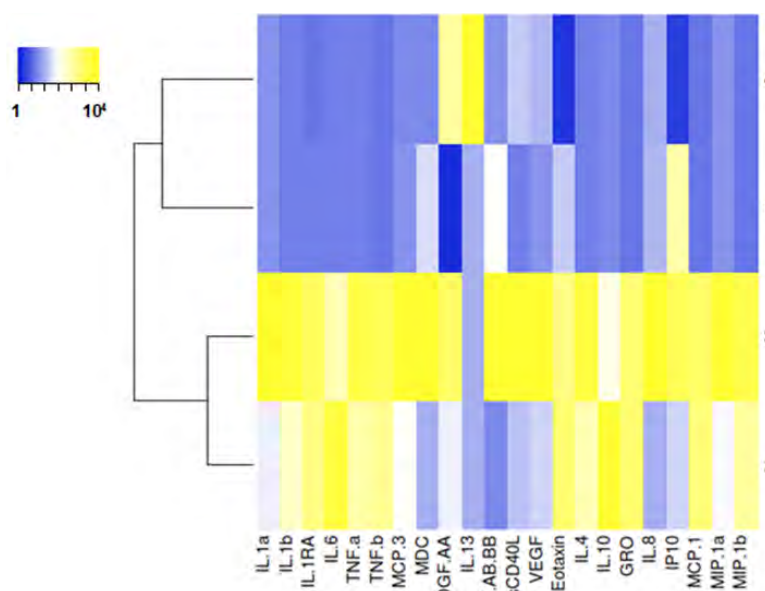


Fig.1. The influence of LPS, MP, and bacteriocin nisin on the production of cytokines, chemokines, and growth factors; 1 – samples with nisin; 2 – samples with lipopolysaccharide; 3 – samples with muramylpeptide; 4 – control samples

macrophages and dendritic cells, maintaining immune homeostasis. The experimentally discovered ability of BOBs to significantly increase the production of IL-10 is an important confirmation of the regulatory role of BOBs on all populations of immunocompetent cells.

The influence of LPS, MP, and bacteriocin nisin on the surface markers of DCs

A study was conducted on the influence of MP, as well as LPS, adrenaline, and noradrenaline in

an ex vivo system. For this, whole blood samples from volunteers were incubated for with MP, LPS and bacteriocin nisin. The studies have established that the ex vivo introduction of MP and LPS into the peripheral blood of healthy donors does not affect the gene expression of the chemokine receptor CCR7, while LPS, MP contributed to an increase in the number of CD11c+ DCs (Fig. 2–5).

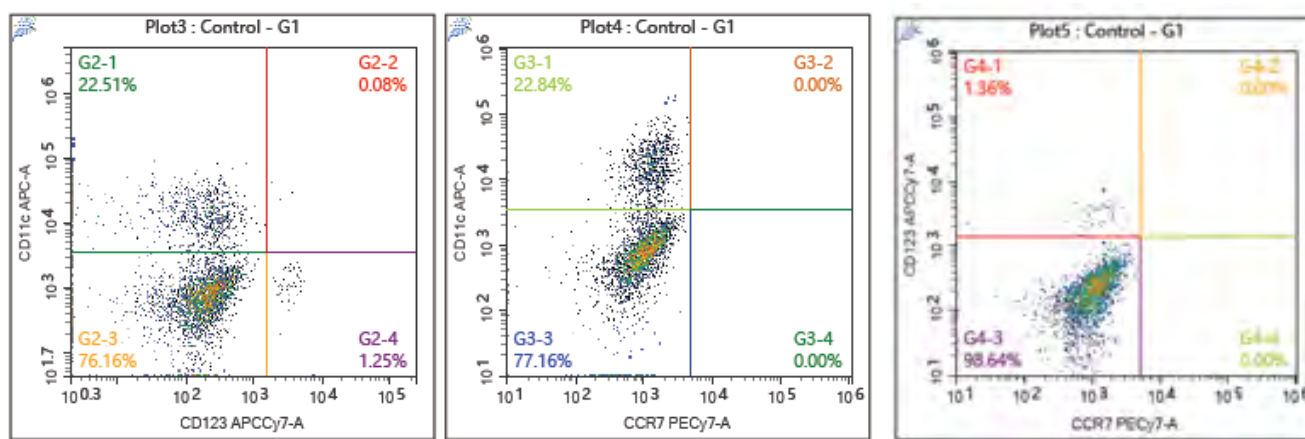


Fig. 2. Expression of dendritic cell markers in the control sample

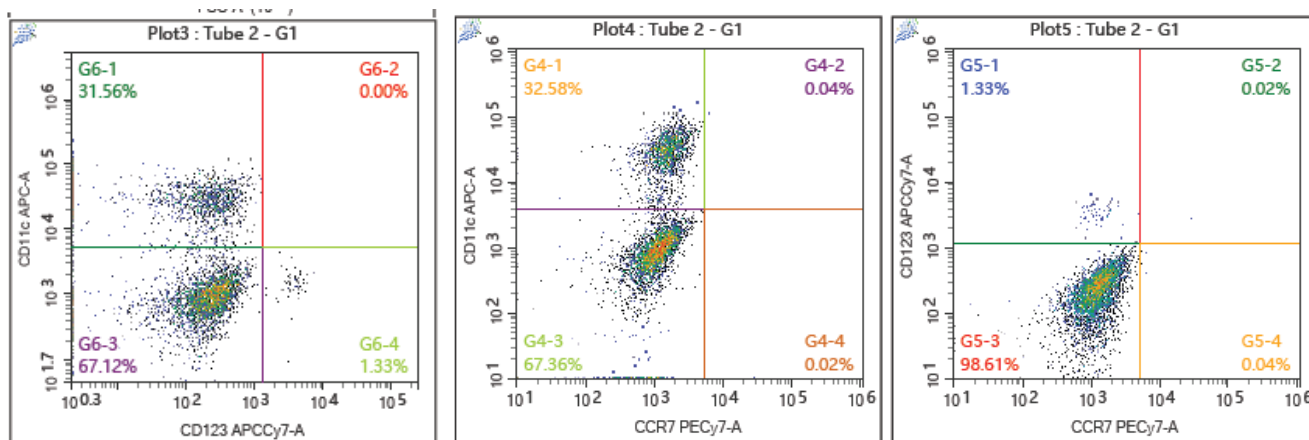


Fig. 3. Expression of dendritic cell markers in the PBMC sample in the presence of MP

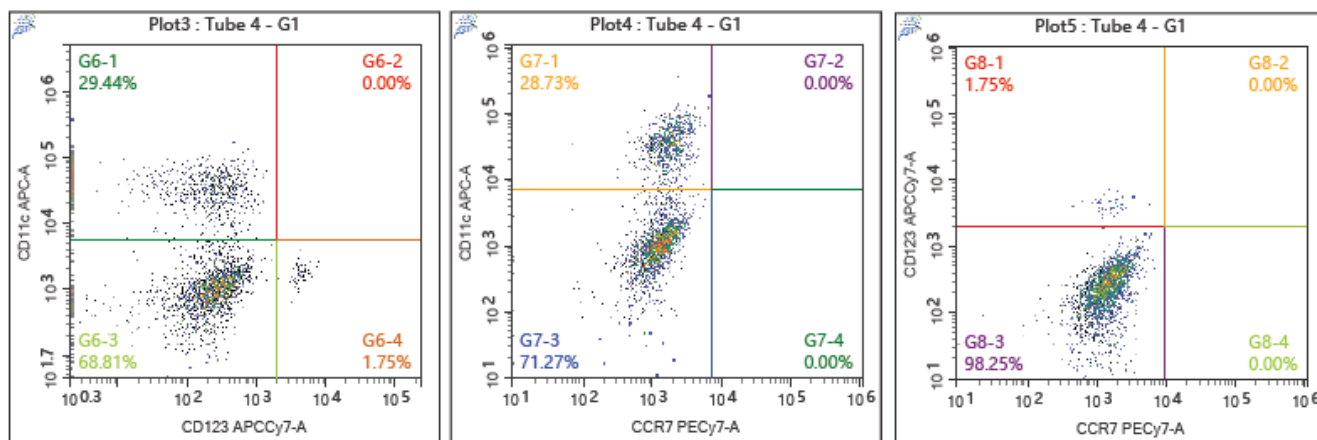


Fig. 4. Expression of dendritic cell markers in the PBMC sample in the presence of LPS

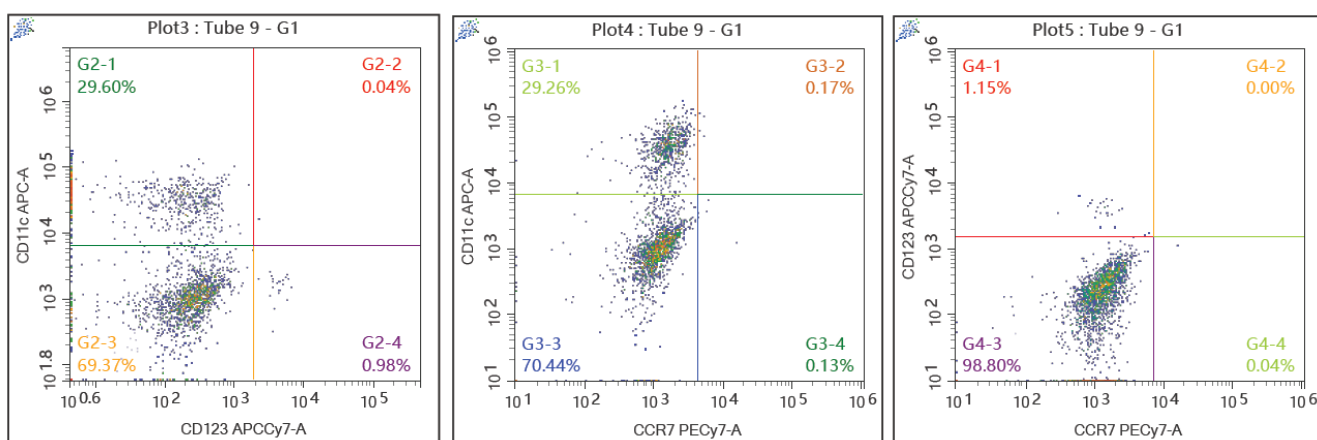


Fig. 5. Expression of dendritic cell markers in the PBMC sample in the presence of nisin

It is important to note that the membrane protein CD11c is the alpha subunit of integrin $\alpha X\beta 2$, as well as the complement receptor 4 (CR4) and integrin CD11c/CD18 interacts with various ligands, including iC3b of the complement system, fibrinogen, with intercellular adhesion molecules (ICAM) or LPS, and ensures the participation of DCs in the remodeling of the extracellular matrix, phagocytosis, migration, and cell adhesion [56]. Furthermore, DCs deprived of CD11c are unable to respond to chemokines induced by inflammatory stimuli, such as MCP, MIP1, MIP3 [57]. According to the study results, MP and LPS increased the number of CD11c+ DCs by 29 %, 31 %, respectively, whereas bacteriocin nisin did not have a statistically significant effect on the studied DC markers (Table).

Change in CD11c expression under the influence of LPS, MP, and nisin, Me (Q0, 25-Q0, 75)

Control	MP	LPS	Nisin
100 % * (91–107)	129 % * (119–139)	131 % * (119–142)	105 % (95–116)

Note: * – significance of differences compared to control values, $p < 0.05$.

It is known that bacterial bioregulators through interaction with epithelial cells, antigen-presenting cells (such as dendritic cells (DCs)), and through the production of signaling metabolites can induce the production of not only pro-inflammatory but also anti-inflammatory cytokines. For example, exopolysaccharides from *Bifidobacterium breve* promote immune tolerance, reducing the production of pro-inflammatory cytokines and preventing the response of B-cells [58]. Early exposure of the immune system to certain bacterial agents may promote tolerance to allergens, preventing allergic diseases [3, 52]. MPs from Gram-positive bacteria can shift the Th1/Th2 balance, providing a therapeutic effect in allergopathologies and have prophylactic effect in prevention of seasonal diseases [59–62]. At the same time, bacterial bioregulators can affect the integrity and function of epithelial barriers, such as the intestinal and respiratory

barriers. Disruptions of these barriers can increase the likelihood of developing allergic reactions [37]. Some bioregulators have the ability to modulate immune responses, for example, by exerting an adjuvant effect [63], or by enhancing regulatory T cells, which can suppress allergic reactions by enhancing regulatory T-cells, suppressing allergic reactions. In particular, the short-chain fatty acid (SCFA) butyrate, produced by commensal microorganisms during starch fermentation, promotes the extrathymic generation of regulatory T-cells (Treg cells) [64, 65].

Some bacteria may promote the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, which may be useful in the context of autoimmune diseases [66, 67]. Bacterial origin bioregulators can help maintain peripheral tolerance in preventing the development of allergic and auto-immune reactions against one's own tissues, including by changing the phenotype of DCs, the mature variants of which are involved in ensuring tolerance [68].

The treatment approach often requires long-term monitoring and adjustments based on patient response. Research in the field of allergic and autoimmune diseases continues, aimed at better understanding the etiology and mechanisms of diseases. This makes it possible to develop new therapeutic approaches and improve existing treatments. For example, in the field of autoimmune diseases, new biologics and cell therapies are being explored that may offer more precise and less toxic treatments. This large-scale study highlights the increasing incidence of these diseases and their impact on public health. These studies highlight the importance of global efforts to improve the understanding, diagnosis, treatment and prevention of autoimmune diseases, highlighting their growing importance as a public health problem. Allergic and autoimmune diseases require a comprehensive approach to management and treatment using modern systems biomedicine approaches [69, 70].

Conclusion

Bacterial origin bioregulators — LPS, GMDP, and nisin modulate the response of immune cells, influencing the production of cytokines, chemokines, growth

factors, and adhesion. The ability of BOBs to reduce the secretion of IL-13 by mononuclear cells by thousands of times and increase IL-10 by tens of times indicates the significant potential of these compounds in maintaining immune homeostasis and in the prevention and treatment of allergic and autoimmune diseases. Bacterial origin bioregulators trigger a negative feedback mechanism by inducing the synthesis of anti-inflammatory factors, that can prevent the inflammatory process.

Cytometric studies of the effect of BOBs on DC differentiation markers showed that not all bacterial origin bioregulators can change the phenotype of DCs: LPS and GMDP increase the expression of CD11c on DCs, while the bacteriocin nisin does not affect the increase in CD11c⁺ of DCs involved in homing and ensuring tolerance in allergic and autoimmune pathologies.

Thus, bacterial cell wall fragments, realizing their activity through innate immunity receptors, to a much greater extent than nisin, induce the production of cytokines, chemokines, and growth factors. The increase in CD11c expression on dendritic cells under the influence of MP and LPS shows their participation in ensuring the remodeling of the extracellular matrix, phagocytosis, migration, and cell adhesion of DCs. In the conducted *ex vivo* experiments, no influence of LPS, MP, and nisin was found on the appearance of differentiation markers CCR7.

Understanding the molecular mechanisms of the influence of bioregulators of bacterial origin on the human body opens up new approaches to the regulation of immune homeostasis, the development of preventive and personalized therapy strategies.

References / Библиографический список

1. Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Cramer R, Lauener R, Akdis, CA. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*. 2013;68(2):161–170. doi:10.1111/all.12085
2. Rosenblum MD, Gratz IK, Paw JS, Abbas AK. Treating human autoimmunity: current practice and future prospects. *Sci Transl Med*. 2012;4(125):125sr1. doi: 10.1126/scitranslmed.3003504.
3. Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat. Rev. Immunol*. 2021;21:739–751. doi:10.1038/s41577-021-00538-7

4. Wang J, Zhou Y, Zhang H. Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther*. 2023;8:138. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01344-4>
5. Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttrop MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ, Shekelle PG. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *JAMA*. 2010;303(18):1848–56. doi: 10.1001/jama.2010.582
6. Linneberg A. The increase in allergy and extended challenges. *Allergy*. 2011;66 Suppl 95:1–3. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02619.x
7. Denton E, O'Hehir RE, Hew M. The changing global prevalence of asthma and atopic dermatitis. *Allergy*. 2023;78(8):2079–2080. doi: 10.1111/all.15754
8. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204–1222. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9
9. Shin YH, Hwang J, Kwon R, Lee SW, Kim MS; GBD 2019 Allergic Disorders Collaborators; Shin JI, Yon DK. Global, regional, and national burden of allergic disorders and their risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Allergy*. 2023;78(8):2232–2254. doi:10.1111/all.15807
10. Frazzei G, van Vollenhoven RF, de Jong BA, Siegelaar SE and van Schaardenburg D. Preclinical Autoimmune Disease: a Comparison of Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes. *Front. Immunol*. 2022;13:899372. doi: 10.3389/fimmu.2022.899372
11. Conrad N, Misra S, Verbakel JY, Verbeke G, Molenberghs G, Taylor PN, Mason J, Sattar N, McMurray JJV, McInnes IB, Khunti K, Cambridge G. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *Lancet*. 2023;401(10391):1878–1890. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00457-9
12. Miller FW. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Curr Opin Immunol*. 2023;80:102266. doi: 10.1016/j.coi.2022.102266
13. Nasonov EL. Modern concept of autoimmunity in rheumatology. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia. Rheumatology Science and Practice*. 2023;61(4):397–420. doi: 10.47360/1995-4484-2023-397-420. (In Russian). [Насонов ЕЛ. Современная концепция аутоиммунитета в ревматологии. *Научно-практическая ревматология*. 2023;61(4):397–420.].
14. Szekanecz Z, McInnes IB, Schett G, Szamosi S, Benkő S, Szűcs G. Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(10):585–595. doi: 10.1038/s41584-021-00652-9
15. Hedrich CM, Tsokos GC. Bridging the gap between autoinflammation and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013;147(3):151–154. doi: 10.1016/j.clim.2013.03.006
16. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol*. 2017;18(7):716–724. doi: 10.1038/ni.3731
17. Hedrich CM. Shaping the spectrum — From autoinflammation to autoimmunity. *Clin Immunol*. 2016;165:21–28. doi: 10.1016/j.clim.2016.03.002

18. Sharkey P, Thomas R. Immune tolerance therapies for autoimmune diseases: Shifting the goalpost to cure. *Curr Opin Pharmacol*. 2022;65:102242. doi: 10.1016/j.coph.2022.102242
19. Lis K, Ukleja-Sokołowska N, Karwowska K, Wernik J, Pawłowska M, Bartuzi Z. The Two-Sided Experimental Model of ImmunoCAP Inhibition Test as a Useful Tool for the Examination of Allergens Cross-Reactivity on the Example of α -Gal and Mammalian Meat Sensitization — A Preliminary Study. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2023;45:1168–1182. <https://doi.org/10.3390/cimb45020077>
20. Kaiser SV, Huynh T, Bacharier LB, Rosenthal JL, Bakel LA, Parkin PC, Cabana MD. Preventing Exacerbations in Preschoolers With Recurrent Wheeze: A Meta-Analysis. *Pediatrics* 2016; 137: e20154496.
21. Pałgan K, Żbikowska-Götz M, Lis K, Chrzaniecka E, Bartuzi Z. Omalizumab improves forced expiratory volume in 1 second in patients with severe asthma. *Postepy Dermatol Alergol*. 2018;35(5):495–497. doi:10.5114/ada.2018.77241
22. Suissa S, Ernst P. Inhaled Corticosteroids: Impact on Asthma Morbidity and Mortality. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2001;107:937–944.
23. Hossny E, Rosario N, Lee BW, Singh M, El-Ghoneimy D, Soh J, Le Souef P. The Use of Inhaled Corticosteroids in Pediatric Asthma: Update. *World Allergy Organ. J*. 2016;9:26.
24. Axelsson, I.; Naumburg, E.; Prietsch, S.O.; Zhang, L. Inhaled Corticosteroids in Children with Persistent Asthma: Effects of Different Drugs and Delivery Devices on Growth. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2019;6: CD010126.
25. van Boven JFM, de Jong-van den Berg LTW, Vegter S. Inhaled Corticosteroids and the Occurrence of Oral Candidiasis: A Prescription Sequence Symmetry Analysis. *Drug Saf*. 2013;36:231–236.
26. Wolfram PM, Allen DB. Effects of Inhaled Corticosteroids on Growth, Bone Metabolism, and Adrenal Function. *Adv. Pediatr*. 2017;64:331–345.
27. Gidaris DK, Stabouli S, Bush A. Beware the Inhaled Steroids or Corticophobia? *Swiss Med. Wkly*. 2021, 151, w20450. doi: 10.4414/smw.2021.20450
28. Bush A. Inhaled Corticosteroid and Children's Growth. *Arch. Dis. Child*. 2014;99:191–192. doi: 10.1136/archdischild-2012-303105
29. McLendon K, Sternard BT. Anaphylaxis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482124/>
30. Sestan M, Kifer N, Arsov T, Cook M, Ellyard J, Vinuesa CG, Jelusic M. The Role of Genetic Risk Factors in Pathogenesis of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45(7):5981–6002. doi: 10.3390/cimb45070378
31. Lv H, Wang Y, Gao Z, Liu P, Qin D, Hua Q, Xu Y. Knowledge mapping of the links between the microbiota and allergic diseases: A bibliometric analysis (2002–2021). *Front Immunol*. 2022;13:1045795. doi: 10.3389/fimmu.2022.1045795
32. Postler TS, Ghosh S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab*. 2017;26(1):110–130. doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.008
33. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(1):20–32. doi: 10.1038/nrmicro3552
34. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1997;21:357–365. doi: 10.1177/0148607197021006357
35. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987;28:1221–1227.
36. Hirata SI, Kunisawa J. Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergol Int*. 2017;66(4):523–528. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.008
37. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol*. 2013;14(7):676–84. doi: 10.1038/ni.2640
38. Gorshkova RP, Isakov VV, Nazarenko EL, Ovodov YS, Guryanova SV, Dmitriev BA. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Yersinia kristensenii* O:25.35. *Carbohydr. Res*. 1993;241:201–208. doi: 10.1016/0008-6215(93)80106-o
39. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, Bai Y, Qin Y, Li J, Feng S, Zhao P. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation. *Mol Med Rep*. 2018;17(4):5484–5491. doi: 10.3892/mmr.2018.8542
40. Sangaran PG, Ibrahim ZA, Chik Z, Mohamed Z, Ahmadiani A. Lipopolysaccharide Pre-conditioning Attenuates Pro-inflammatory Responses and Promotes Cytoprotective Effect in Differentiated PC12 Cell Lines via Pre-activation of Toll-Like Receptor-4 Signaling Pathway Leading to the Inhibition of Caspase-3/ Nuclear Factor-kappa B Pathway. *Front Cell Neurosci*. 2021;14:598453. doi: 10.3389/fncel.2020.598453
41. DeForge LE, Remick DG. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;174(1):18–24. doi: 10.1016/0006-291x(91)90478-p.
42. Khan, A.W.; Farooq, M.; Hwang, M.-J.; Haseeb, M.; Choi, S. Autoimmune Neuroinflammatory Diseases: Role of Interleukins. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24:7960. <https://doi.org/10.3390/ijms24097960>
43. Hartman DA, Ochalski SJ, Carlson RP. The effects of anti-inflammatory and antiallergic drugs on cytokine release after stimulation of human whole blood by lipopolysaccharide and zymosan A. *Inflamm Res*. 1995;44(7):269–74. doi: 10.1007/BF02032567
44. Guryanova SV, Gigani OB, Gudima GO, Kataeva AM, Kolesnikova NV. Dual Effect of Low-Molecular-Weight Bioregulators of Bacterial Origin in Experimental Model of Asthma. *Life*. 2022;12:192. <https://doi.org/10.3390/life12020192>
45. Meng CY, Gong XL, Zhao R, Lu Q, Dong XY. [Effect of maternal exposure to lipopolysaccharide during pregnancy on allergic asthma in offspring in mice]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2022;60(4):302–306. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112140-20220130-00100
46. Chovanova L, Vlcek M, Krskova K, Penesova A, Radikova Z, Rovensky J, Cholujova D, Sedlak J, Imrich R. Increased production of IL-6 and IL-17 in lipopolysaccharide-stimulated peripheral mononuclears from patients with rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys*. 2013;32(3):395–404. doi: 10.4149/gpb_2013043
47. Li Y, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res*. 2001;61(3):253–62. doi: 10.1006/mvres.2001.2304
48. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2001;1:135–145. doi: 10.1038/35100529
49. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem*. 2003;278:8869–8872. doi: 10.1074/jbc.C200651200


50. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5509–12. doi: 10.1074/jbc.C200673200
51. Guryanova SV. Immunomodulation, Bioavailability and Safety of Bacteriocins. *Life.* 2023;13:1521. <https://doi.org/10.3390/life13071521>
52. Guryanova SV, Kataeva A. Inflammation Regulation by Bacterial Molecular Patterns. *Biomedicines.* 2023;11:183. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010183>
53. Osornio-Vargas AR, Goodell AL, Hernández-Rodríguez NA, Brody AR, Coin PG, Badgett A, Bonner JC. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA, -AB, and -BB induce differential chemotaxis of early-passage rat lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(1):33–40. doi: 10.1165/ajrcmb.12.1.7811469
54. Ke F, Xie P, Yang Y, Yan L, Guo A, Yang J, Zhang J, Liu L, Wang Q and Gao X. Effects of Nisin, Cecropin, and Penthorum chinense Pursh on the Intestinal Microbiome of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Front. Nutr.* 2021;8:729437. doi: 10.3389/fnut.2021.729437
55. Brand AM, Smith C, Dicks LMT. The Effects of Continuous In Vivo Administration of Nisin on *Staphylococcus aureus* Infection and Immune Response in Mice. *Probiotics and Antimicrob. Prot.* 2013;5:279–286. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9141-3>
56. Lukácsi S, Gerecsei T, Balázs K, Francz B, Szabó B, Erdei A, Bajtaj Z. The differential role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in the adherence, migration and podosome formation of human macrophages and dendritic cells under inflammatory conditions. *PLoS One.* 2020 May 4;15(5): e0232432. doi: 10.1371/journal.pone.0232432
57. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol.* 2000;22(4):345–69. doi: 10.1007/s002810000053
58. Fanning S, Hall LJ, Cronin M, Zomer A, MacSharry J, Goulding D, Motherway MO, Shanahan F, Nally K, Dougan G, van Sinderen D. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(6):2108–13. doi: 10.1073/pnas.1115621109
59. Guryanova SV, Kozlov IG, Meshcheryakova EA, Alekseeva LG, Andronova TM. Investigation into the influence of glucosaminylmuramyl dipeptide on the normalization of Th1/Th2 balance in patients with atopic bronchial asthma. *Immunol.* 2009;30:305–309. (In Russian)
60. Guryanova SV, Khaitov RM. Glucosaminylmuramyl dipeptide — GMDP: effect on mucosal immunity (on the issue of immunotherapy and immunoprophylaxis). *Immunologiya.* 2020;41(2):174–83. (in Russian). doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-174-183 [Гурьянова С.В., Хаитов РМ. Глюкозаминилмурамилдипептид — ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики). *Иммунология.* 2020, 41 (2): 174–183. doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-174-183].
61. Guryanova SV, Kudryashova NA, Kataeva AA, Orozbekova BT, Kolesnikova NV, Chuchalin AG. Novel approaches to increase resistance to acute respiratory infections. *RUDN Journal of Medicine.* 2021;25(3):181–195. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-3-181-195
62. Korzhenevsky AA, Korzhenevskaya NP. Immunotherapy at the modern stage: types and tactics of application. *RUDN Journal of Medicine.* 2022;26(4):404–421. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-4-404-421 [Корженевский А.А., Корженевская Н.П. Иммунотерапия на современном этапе: виды и тактика применения. *Вестник Российского университета дружбы народов.* Серия: Медицина. 2022. Т. 26. No 4. С. 404–421. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-4-404-421].
63. Rechkina EA, Denisova GF, Masalova OV, Lideman LF, Denisov DA, Lesnova EI, Ataulakhanov RI, Gur'ianova SV, Kushch AA. [Epitope mapping of antigenic determinants of hepatitis C virus proteins by phage display]. *Mol Biol (Mosk).* 2006;40(2):357–68. (In Russian). PMID: 16637277.
64. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikay S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451–5. doi: 10.1038/nature12726
65. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013;504(7480):446–50. doi: 10.1038/nature12721
66. Miller ZA, Rankin KP, Graff-Radford NR, Takada LT, Sturm VE, Cleveland CM, Criswell LA, Jaeger PA, Stan T, Heggeli KA, Hsu SC, Karydas A, Khan BK, Grinberg LT, Gorno-Tempini ML, Boxer AL, Rosen HJ, Kramer JH, Coppola G, Geschwind DH, Rademakers R, Seeley WW, Wyss-Coray T, Miller BL. TDP-43 frontotemporal lobar degeneration and autoimmune disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(9):956–62. doi: 10.1136/jnnp-2012-304644
67. Marietta EV, Murray JA, Luckey DH, Jeraldo PR, Lamba A, Patel R, Luthra HS, Mangalam A, Taneja V. Suppression of Inflammatory Arthritis by Human Gut-Derived *Prevotella histicola* in Humanized Mice. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(12):2878–2888. doi: 10.1002/art.39785
68. Li H, Zhang GX, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, Rostami A. CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008;181(4):2483–93. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2483
69. Guryanova S, Guryanova A. sbv IMPROVER: Modern approach to systems biology. *Methods Mol. Biol.* 2017;1613:21–29. doi: 10.1007/978-1-4939-7027-8_2
70. Hoeng J, Boue S, Fields B, Park J, Peitsch MC, Schlage WK, Talikka M, Performers, TCB, Binenbaum I, Bondarenko V, Bulgakov OV, Cherkasova V, Diaz-Diaz N, Fedorova L, Guryanova S, Guzova J, Igorevna Koroleva G, Kozhemyakina E, Kumar R, Lavid N, Lu Q, Menon S, Ouliel Y, Peterson SC, Prokhorov A, Sanders E, Schrier S, Schwaitzer Neta G, Shvydchenko I, Tallam A, Villa-Fombuena G, Wu J, Yudkevich I, Zelikman M. Enhancement of COPD biological networks using a web-based collaboration interface. *F1000Research* 2015, 4. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5984.2>

Механизмы регуляции аллергических и аутоиммунных реакций биорегуляторами бактериального происхождения

С.В. Гурьянова^{1,2}  , И.А. Сигматулин³ , О.О. Гигани² , С.А. Липкина³

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва, Российская Федерация

² Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, г. Москва, Российская Федерация

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Российская Федерация
 svgur@mail.ru

Аннотация. *Актуальность.* Рост аллергических и аутоиммунных заболеваний, наблюдающийся в последние десятилетия, актуализирует задачу терапии и профилактики их возникновения, что требует детальных исследований механизмов их появления. На возникновение и прогрессирование аллергических и аутоиммунных заболеваний влияют генетическая предрасположенность, образ жизни, факторы окружающей среды, нарушения согласованной работы иммунной системы и, как следствие, иммунного гомеостаза. Лечение этих заболеваний преимущественно симптоматическое и часто сопровождается нежелательными побочными эффектами. Нарушения иммунной системы при различных патологиях имеют свои особенности для каждого вида заболевания и в то же время имеют общие механизмы. Учитывая наличие в организме человека большого количества различных микроорганизмов, учет их влияния имеет первостепенное значение. Микроорганизмы являются источником биологически активных молекул, действие которых может как предотвратить и уменьшить тяжесть заболевания, так и усугубить его. Целью настоящего исследования был анализ цитокинового профиля действия фрагментов клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий — липополисахарида (ЛПС) и мурамилпептида (МП), а также низина — антимикробного пептида бактериальной природы. происхождения на мононуклеарных клетках человека. *Материалы и методы.* Мононуклеарные клетки получали из периферической крови здоровых добровольцев с использованием среды для разделения клеток Lympholyte CL 5015 и культивировали в присутствии ЛПС, ГМДП и бактериоцина низина. Цитокиновую активность ЛПС, ГМДП и бактериоциннизина исследовали с помощью мультиплексного цитокинового анализа; анализ поверхностных маркеров определяли проточной цитометрией. *Результаты и обсуждение.* Показано, что фрагменты клеточной стенки бактерий в значительно большей степени, чем низин, индуцируют продукцию цитокинов, хемокинов и факторов роста. Установлено, что ЛПС и МП повышают экспрессию CD11c на дендритных клетках, тогда как бактериоцин низин не влияет на увеличение CD11c+ ДК. ЛПС и МП в проведенных исследованиях *ex vivo* не влияли на появление CCR7. *Выводы.* Биорегуляторы бактериального происхождения запускают механизм отрицательной обратной связи, индуцируя синтез противовоспалительных факторов, способных предотвратить воспалительный процесс. Понимание молекулярных механизмов влияния биорегуляторов бактериального происхождения на организм человека открывает новые подходы в профилактике и разработке стратегий персонализированной терапии.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, иммунный гомеостаз, аллергия, аутоиммунитет, толерантность, ЛПС, липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептид, мурамилпептид, низин, регуляция воспаления, биорегуляторы бактериального происхождения

Информация о финансировании. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Вклад авторов: С.В. Гурьянова — разработка дизайна исследования; С.В. Гурьянова, И.А. Сигматулин, О.О. Гигани, С.А. Липкина — исследования методами иммуноферментного анализа и цитометрические исследования; С.В. Гу-

Гурьянова, И.А. Сигматулин, О.О. Гигани, С.А. Липкина — подготовка рукописи. Все авторы прочитали и согласились с окончательной версией рукописи.

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

Благодарности — неприменимо.

Этическое утверждение. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом РУДН.

Информированное согласие на публикацию. От всех участников исследования было получено добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании, обработку персональных данных и публикацию данной статьи.

Поступила 04.09.2023. Принята 03.10.2023.

Для цитирования: Guryanova S.V., Sigmatulin I.A., Gigani O.O., Lipkina S.A. Mechanisms of regulation allergic and autoimmune reactions by bacterial origin bioregulators // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 470–482. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–470–482

Corresponding author: Svetlana V. Guryanova — PhD, Associate Professor, Department of Biology and General Genetics, Institute of Medicine, RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russian Federation, 177997, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, Russian Federation. E-mail: svgur@mail.ru

Guryanova S.V. ORCID 0000–0001–6186–2462

Gigani O.O. ORCID 0000–0002–7720–0727

Sigmatulin I.A. ORCID 0009–0008–2254–6932

Ответственный за переписку: Гурьянова Светлана Владимировна — кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и общей генетики медицинского института РУДН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10. E-mail: svgur@mail.ru

Гурьянова С.В. SPIN 6722–8695; ORCID 0000–0001–6186–2462

Гигани О.О. SPIN 6541–3241; ORCID 0000–0002–7720–0727

Сигматулин И.А. ORCID 0009–0008–2254–6932



ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ HEALTH POLICY AND PUBLIC HEALTH

DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-483-495

EDN: IOXLLJ


ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Эпидемиология цереброваскулярных болезней у сельских жителей Ставропольского края в контексте реализации краевой программы «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае»

А.Ю. Абрамов¹ , А.А. Муравьева² , Ю.В. Михайлова³  , С.А. Стерликов³ 

¹ Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

² Ставропольский государственный медицинский университет, г. Ставрополь, Российская Федерация

³ Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения, г. Москва, Российская Федерация
 Muravyeva81@mail.ru

Аннотация. *Актуальность.* В ходе реализации программы по борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае были проведены мероприятия по профилактике геморрагических и ишемических инсультов, обучению медицинского персонала методам своевременного выявления цереброваскулярных болезней (ЦВБ), распознавания (в том числе — путём обучения широких слоёв населения) и маршрутизации пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения, в период пандемии — открытие специализированных отделений. Данный организационный эксперимент требовал оценки его воздействия на самую сложную в медицинском плане группу населения — сельских жителей. *Цель:* в динамике изучить эпидемическую ситуацию по ЦВБ среди сельского населения в Ставропольском крае по сравнению с Российской Федерацией. *Материалы и методы.* Изучены сведения форм статистического наблюдения № 12-село в период с 2010 по 2022 гг., С51 в период с 2014 по 2022 гг. *Результаты и обсуждение.* В период с 2010 по 2022 гг. отмечался рост первичной заболеваемости ЦВБ сельского населения с 464,6 до 1045,1 на 100 000 сельского населения, который частично обусловлен старением населения, а частично — улучшением диагностики ЦВБ. Общая заболеваемость ЦВБ выросла с 1275,5 до 3416,1, что позволяет сделать вывод об улучшении выживаемости пациентов. Заболеваемость инсультами всех видов имела тенденцию к снижению, что свидетельствует о результативности воздействия

© Абрамов А.Ю., Муравьева А.А., Михайлова Ю.В., Стерликов С.А., 2023



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

на факторы риска их развития. Значительно снижалась заболеваемость неуточнёнными инсультами, что привело к росту первичной заболеваемости инфарктами мозга (который, однако, в Ставропольском крае рос медленнее, чем в целом по РФ; коэффициенты уравнений регрессии составили 2,5 и 4,3, соответственно). В период с 2015 по 2022 гг. быстро (относительно показателя по Российской Федерации) снижались показатели смертности (с 208,4 до 161,1) и летальности (с 5,8 до 2,8) от ЦВБ. **Выводы.** Предлагаемый комплекс мероприятий по борьбе с цереброваскулярными болезнями, включающий профилактические мероприятия, систему социальной мобилизации, FAST-теста, системы маршрутизации пациентов с доставкой подлежащих лиц в сосудистые центры в течение часа, своевременного реагирования на новые факторы риска развития ЦВБ был результативен и может быть рекомендован к внедрению в сходных территориях с высокой долей сельского населения.

Ключевые слова: цереброваскулярные болезни; сельское население; снижение потерь от цереброваскулярных болезней; оценка программ

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

Вклад авторов. Абрамов А.Ю. — концепция и дизайн исследования; Михайлова Ю.В. — редактирование исследования; Муравьева А.А. — сбор и обработка материалов, написание текста; Стерликов С.А. — анализ полученных данных, написание текста. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

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

Этическое утверждение — неприменимо.

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 24.10.2023. Принята 14.11.2023.

Для цитирования: Абрамов А.Ю., Муравьева А.А., Михайлова Ю.В., Стерликов С.А. Эпидемиология цереброваскулярных болезней у сельских жителей Ставропольского края в контексте реализации краевой программы «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае» // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 483–495. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-483-495

Cerebrovascular diseases epidemiology in the Stavropol region rural residents in the implementation context of the regional program «Fighting mediavascular diseases in the Stavropol region»

Alexei Y. Abramov¹ , Alla A. Muravyeva² , Julia V. Mikhaylova³  , Sergey A. Sterlikov³ 

¹ RUDN University, Moscow, Russian Federation

² Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

³ Russian Research Institute of Health, Moscow, Russian Federation

✉ Muravyeva81@mail.ru

Abstract. Relevance. During the implementation of the program for the prevention and treatment of cardiovascular diseases in the Stavropol Territory, measures were taken to prevent hemorrhagic and ischemic strokes, train medical personnel in methods of timely detection of cerebrovascular diseases (CVD), recognition (including through training of the general population) and routing patients with acute cerebrovascular accidents; during a pandemic, opening specialized

departments. This organizational experiment required an assessment of its impact on the most medically complex group of the population — rural residents. *The aim* was to study in dynamics the epidemic situation of CVD among the rural population in the Stavropol Territory in comparison with the Russian Federation. *Materials and Methods*. Information from official statistical observation forms on the incidence of CVD and mortality from them was studied. *Results and Discussion*. In the period from 2010 to 2022, there was an increase in the incidence of CVD in the rural population from 464.6 to 1045.1 per 100,000 rural population, which is partly due to the aging of the population, and partly due to improved diagnosis of CVD. The overall incidence of CVD increased from 1275.5 to 3416.1, which suggests an improvement in patient survival. The incidence of strokes of all types tended to decrease, which indicates the effectiveness of the impact on the risk factors for their development. The incidence of unspecified strokes decreased significantly, which led to an increase in the primary incidence of cerebral infarctions (which, however, grew more slowly in the Stavropol Territory than in the Russian Federation as a whole; the coefficients of the regression equations were 2.5 and 4.3, respectively). Between 2015 and 2022, the mortality rates (from 208.4 to 161.1) and mortality (from 5.8 to 2.8) from CVD decreased rapidly (relative to mortality from CVD in the Russian Federation). *Conclusion*. The proposed set of measures for the prevention and treatment of CVD, including preventive measures, a system of social mobilization, FAST-test, patient routing systems with the delivery of eligible persons to vascular centers within an hour, timely response to new risk factors for the development of CVD, was effective and can be recommended for implementation in similar areas with a high proportion of rural population.

Keywords: cerebrovascular diseases, rural population, reduction of losses from cerebrovascular diseases, program evaluation

Funding. The authors received no financial support for the research, authorship, and publication of this article.

Author contributions. Abramov A. Yu. — concept and design of the study; Mikhailova Yu.V. — editing the study; Muravyova A.A. — collection and processing of materials, writing text; Sterlikov S.A. — analysis of the obtained data, writing the text. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, and read and approved the final version before publication.

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

Acknowledgements — not applicable.

Ethics approval — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 24.10.2023 Accepted 14.11.2023.

For citation: Abramov AY, Muravyeva AA, Mikhaylova Yu V., Sterlikov SA. Cerebrovascular diseases epidemiology in the Stavropol region rural residents in the implementation context of the regional program «Fighting mediavascular diseases in the Stavropol region». *RUDN Journal of Medicine*. 2023; 27(4):483–495. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–483–495

Введение

Цереброваскулярные играют существенную роль в заболеваемости и смертности населения, особенно — старше трудоспособного возраста. Ситуация с болезнями системы кровообращения (БСК), в том числе — с цереброваскулярными болезнями (ЦВБ) в Ставропольском крае ещё в первом десятилетии XXI века была признана неблагоприятной: доля болезней системы кровообращения в общей структуре смертности населения составила 61,2 %, а в структуре потерь трудового потенциала — 23,7 %. В период перед пандемии COVID-19

цереброваскулярные болезни (ЦВБ) занимали третье место в структуре болезней системы кровообращения — 18,7 % [1].

Существенную роль в развитии ЦВБ играют факторы риска, распространённость которых в городской и сельской местности может существенно различаться. Так, по данным глобальной оценки распространённости сахарного диабета отмечается, что в городской местности она выше, чем в сельской [2]. Среди сельских жителей выше уровень физических нагрузок, что препятствует развитию ряда ЦВБ. в первую очередь — инсуль-

тов. Фибрилляция предсердий как этиологический фактор инфарктов мозга превалирует у городских жителей [3]. В то же время, артериальная гипертензия как этиологический фактор геморрагических инсультов чаще встречается у сельских жителей [3]. Важным фактором предотвращения смерти является мотивация сельских жителей к здоровому образу жизни, включая здоровое питание и отказ от вредных привычек [4]; особенно важную роль в предотвращении смерти от ЦВБ играет усиление мер по борьбе со злоупотреблением алкоголем [5]. Поскольку доступность медицинской помощи и факторы риска развития болезней системы кровообращения у жителей городских и сельских поселений не одинаковы, целесообразен отдельный анализ их заболеваемости и смертности [5].

В общемировой практике крупных развитых стран Wu S. et al [6] также отмечают неравномерность доступности специализированной помощи при инсульте, особенно выраженную в сельской местности. S.M. Jackson et al. отмечают, что выжившие после инсульта, выздоравливающие в сельских и отдаленных районах, часто имеют ограниченный доступ к реабилитационным услугам или вообще не имеют его [7]. E.C. Leira et al. отмечают неоптимальность практики оказания медицинской помощи при инсультах в сельской местности США, увеличивающийся разрыв качества оказания медицинской помощи при инсультах в городской и сельской местности; при этом имеются проблемы на догоспитальном этапе, помощи в отделении неотложной помощи сельской участковой больницы, и межбольничном переводе пациентов [8].

Эпидемиологические исследования, касающиеся инфекционных и неинфекционных заболеваний, позволяют как определить основные направления программных мероприятий по предотвращению заболеваемости, смертности или ущерба от них, так и оценить ход реализации уже имеющихся программ [9]. О.А. Ключихина и соавт. при анализе заболеваемости инсультом и смертности от него в регионах России на территориях, вошедших в федеральную программу реорганизации помощи пациентам с инсультом с 2009 по 2016 г. выявили,

что заболеваемость инсультом зависит от качества и эффективности первичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, а показатели смертности зависят в первую очередь от качества диагностики и специализированной медицинской помощи, оказываемой пациентам с инсультом [10].

Ставропольский край в период с 2009 по 2016 г. также входил в федеральную программу реорганизации помощи пациентам с инсультом; в нём был зарегистрирован средний уровень среднемноголетней заболеваемости: 3,33–3,81 на 1000 населения, однако в нём отмечался высокий уровень среднемноголетней смертности от инсульта [10]. Следует отметить, что, в силу географических и климатических особенностей, в экономике Ставропольского края важное значение имеет аграрное производство, благодаря чему он является субъектом Российской Федерации с высокой долей сельского населения (в 2018 г. — 41,6 %, в то время как в целом по России — 25,4 %).

Тем не менее, в рамках федеральной программы было создано 10 центров здоровья, 6 кабинетов и 32 отделения медицинской профилактики, активизировалась работа по социальной рекламе и пропаганде здорового образа жизни в СМИ, была разработана система маршрутизации пациентов и обеспечения преимущественности оказания медицинской помощи на всех этапах.

Учитывая результаты участия в Федеральной программе и региональные особенности расселения, в Ставропольском крае был разработан комплекс мероприятий по снижению заболеваемости ЦВБ и смертности от них, вошедших в краевую программу по борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае [11] (далее — Программа). В рамках Программы осуществлялись мероприятия по воздействию на факторы риска:

— профилактика геморрагических инсультов путём воздействия на факторы риска: расширения оказания населению помощи по отказу от употребления алкоголя, усиление контроля за артериальной гипертензией, в том числе — путём создания школ пациентов, увеличением охвата диспансерным наблюдением лиц с высоким и очень высоким сердечно-сосудистым риском;

— профилактика инфарктов мозга путём воздействия на факторы риска: организация социальной рекламы здорового образа жизни, принципов здорового питания, методов первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, диспансеризации и профилактического обследования, помощь в отказе от курения;

— улучшения своевременного выявления ЦВБ путём проведения обучающих семинаров с врачами первичного звена и средним медицинским персоналом по вопросам раннего выявления ЦВБ и маршрутизации пациентов, утверждение планов профилактических осмотров и диспансеризации взрослого населения, внедрение внутреннего контроля качества медицинской помощи пациентам с болезнями системы кровообращения. Проведены мероприятия по социальной мобилизации (обучение широких (до 1/3 населения края) слоёв населения методам своевременного выявления острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) и алгоритму действия в этом случае), среди диспетчеров станций скорой медицинской помощи внедрён FAST-тест, проводимый путём интервьюирования по телефону и направления в зависимости от его результатов бригад разного профиля;

— совершенствование оказания медицинской помощи больным с ОНМК: развёртывание 6 первичных и 2 региональных сосудистых центров, позволивших снизить время доставки пациентов, в первичное сосудистое отделение до 1 часа.

Кроме того, учитывая увеличение риска тромботических осложнений в период пандемии COVID-19 [12–14], было создано три специализированных отделения для лечения пациентов с болезнями системы кровообращения, сочетанными с COVID-19.

Проведённый нами организационный эксперимент требовал оценки, того какое влияние данное воздействие оказало на эпидемиологию ЦВБ среди сельского населения; данный вопрос мы до настоящего времени не изучали. Аналогичных исследований (равно как и исследований, рассматривающих эпидемиологию ЦВБ среди сельского населения) нам так же найти не удалось.

Цель исследования: в динамике изучить эпидемическую ситуацию по ЦВБ среди сельского населения в Ставропольском крае по сравнению с Российской Федерацией.

Материалы и методы

Изучены сведения формы Федерального статистического наблюдения № 12-село «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у пациентов, проживающих в районе обслуживания медицинской организации» за 2010–2022 гг., разрез по сельскому населению (далее — ф. 12-село). Сравнение динамики показателей, отражающих заболеваемость ЦВБ проводили по сравнению с динамикой аналогичных показателей в целом по Российской Федерацией, поскольку возрастная структура населения Ставропольского края ближе к таковой в целом по России, чем к остальным субъектам, входящим в состав СКФО (Северо-Кавказский федеральный округ) [15].

В ходе статистической обработки информации с целью максимального нивелирования возрастных факторов (в динамике происходило как старение населения России, так и старение населения Ставропольского края, что влияет на заболеваемость ЦВБ) проводили процедуру стандартизации показателей заболеваемости, аналогичной описанной нами ранее [1].

Показатели первичной и общей заболеваемости ЦВБ (в т.ч. по отдельным нозологическим единицам и их группам) рассчитывали по данным ф. 12-село как умноженное на 100 000 отношение числа зарегистрированных случаев заболеваний (в том числе — впервые) к среднегодовой численности сельского населения.

Смертность сельского населения от ЦВБ изучали по данным формы № С51 «Распределение умерших по полу, возрастным группам и причинам смерти» (далее — ф. С51) с 2015 по 2022 гг. Показатель смертности рассчитывали как умноженное на 100 000 отношение числа сельских жителей, умерших от ЦВБ к среднегодовой численности сельского населения.

Показатель летальности населения Российской Федерации и Ставропольского края от ЦВБ рассчитывали как умноженное на 100 отношение числа умерших от ЦВБ по данным ф. С51 к общему числу обратившихся в медицинские организации по поводу ЦВБ по данным ф. 12-село.

В ходе статистической обработки информации рассчитывали экстенсивные, интенсивные и стандартизованные показатели, их средние значения проводили корреляционный и регрессионный анализ методом наименьших квадратов. Предварительно перед применением методов анализировали тип распределением с использованием теста Шапиро-Уилка (во всех случаях проводимого анализа подтвердился нормальный тип распределения данных).

Результаты и обсуждение

Доля ЦВБ в структуре БСК у сельских жителей Ставропольского края выше, чем среди остальных субъектов, входящих в СКФО и в целом по РФ: $27,9 \pm 0,2$ (0,9), $15,8 \pm 1,0$ (3,5) и $22,0 \pm 0,2$ (0,9), соответственно; $p < 0,0001$. В Ставропольском крае доля больных ЦВБ среди БСК среди сельских жителей незначительно отличалась от таковой среди всего населения ($25,2 \pm 1,1$ (3,9); $p = 0,05$).

Динамика показателя первичной заболеваемости ЦВБ сельских жителей представлена на рис. 1.

В Ставропольском крае в 2011 г. отмечался скачкообразный рост заболеваемости ЦРБ сельских жителей, который был связан со статистическими причинами: повышением учёта остаточных изменений после ЦВБ. тем не менее, на протяжении всего периода наблюдения сохранялась тенденция к росту первичной заболеваемости ЦВБ. Данная тенденция была мало выражена в целом по РФ.

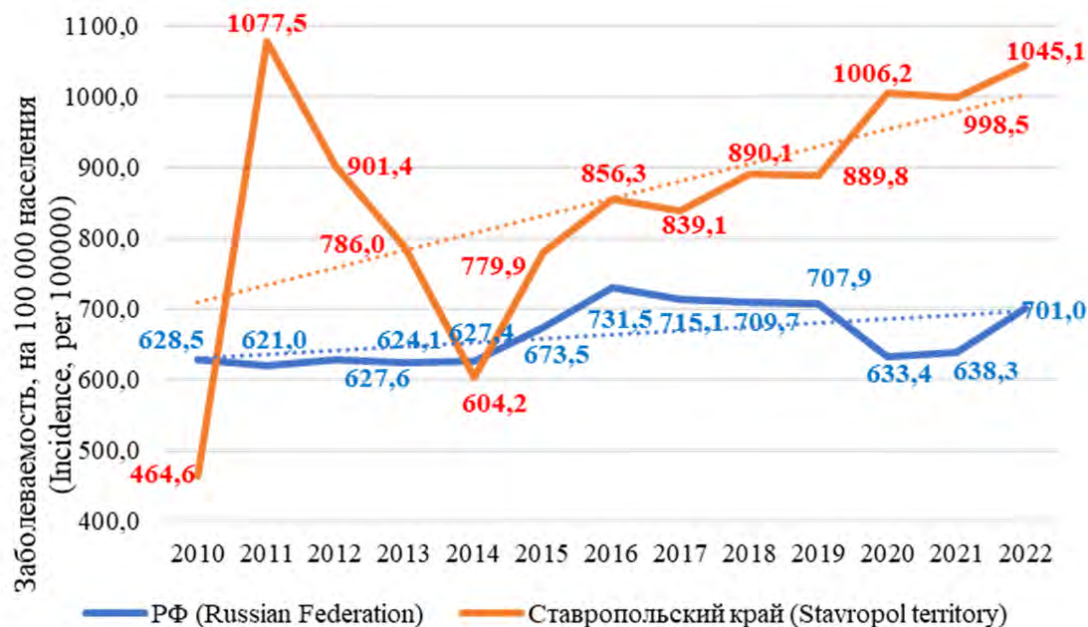


Рис. 1. Динамика показателя первичной заболеваемости ЦВБ сельских жителей в целом по РФ и по Ставропольскому краю в 2010–2022 гг.

Fig. 1. Dynamics of the primary incidence of CVD among rural residents in the Russian Federation as a whole and in the Stavropol Territory in 2010–2022

В ходе поиска причин данного явления следует уточнить, не обусловлена ли она в первую очередь возрастными особенностями заболеваемости. В связи с этим мы рассмотрели динамику стандартизованного показателя первичной заболеваемости ЦВБ (рис. 2).

В отличие от нестандартизованного показателя, роста показателя первичной заболеваемости не было. Коэффициент уравнения линейной регрессии был отрицательным: $-2,5$ (при удалении аномального значения показателя в 2011 году — положительным: $+6,9$). Таким образом, возраст является одной из составляющей роста показателя первичной заболеваемости ЦВБ сельского населения Ставропольского края.

Также в Ставропольском крае, в отличие от РФ, отмечался рост показателя общей заболеваемости ЦВБ (рис. 3).

Стандартизованный по возрасту показатель общей заболеваемости ЦВБ сельских жителей в Ставропольском крае, в отличие от стандартизованного показателя в целом по РФ, также показывал тенденцию к росту, особенно выраженную в период с 2015 по 2022 гг. (2010 г. — 1275,5; 2011 г. — 2005,0; 2012 г. — 1954,8; 2013 г. — 1845,8; 2014 г. — 1765,3; 2015 г. — 2123,3; 2016 г. — 2360,2; 2017 г. — 2388,6; 2018 г. — 2627,9; 2019 г. — 2970,7; 2020 г. — 2908,7; 2021 г. — 3119,3; 2022 г. — 3416,1).

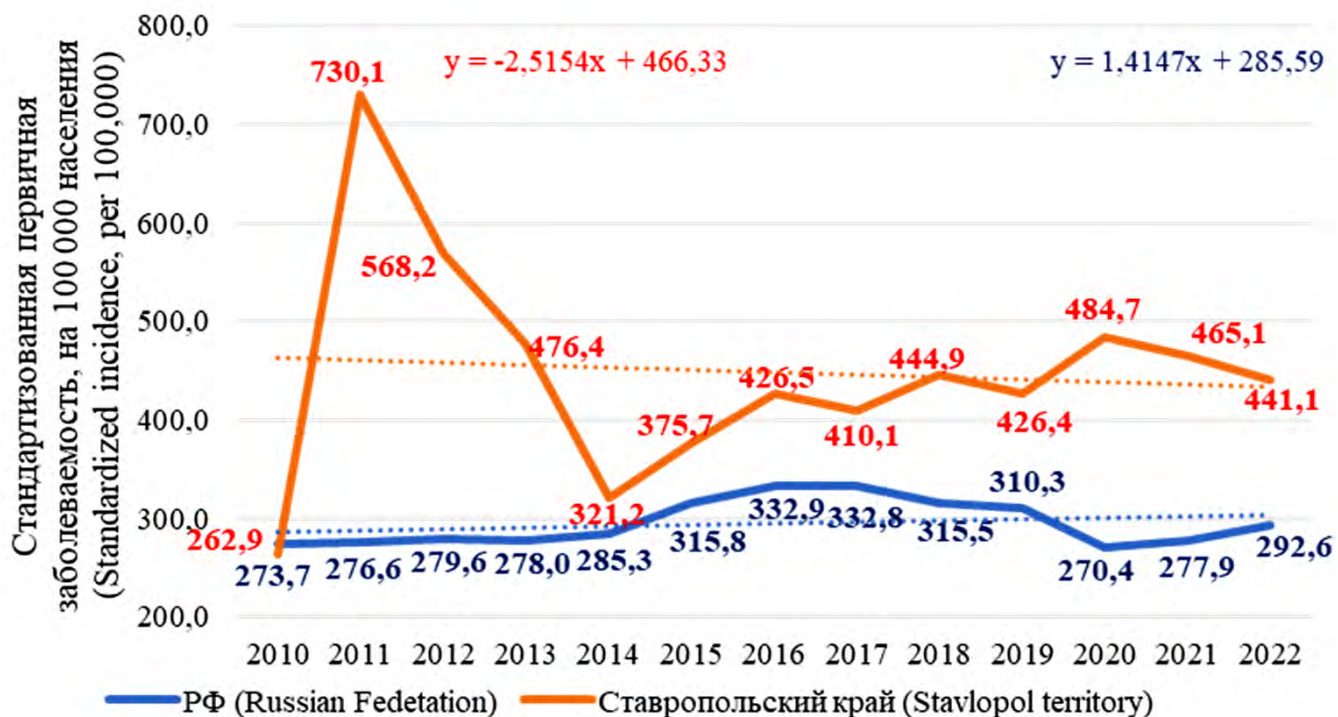


Рис. 2. Динамика стандартизованных по возрасту показателей первичной заболеваемости ЦВБ сельских жителей в целом по РФ и по Ставропольскому краю в 2010–2022 гг.

Fig. 2. Dynamics of age-standardized indicators of primary incidence of CVD in rural residents in the Russian Federation as a whole and in the Stavropol Territory in 2010–2022

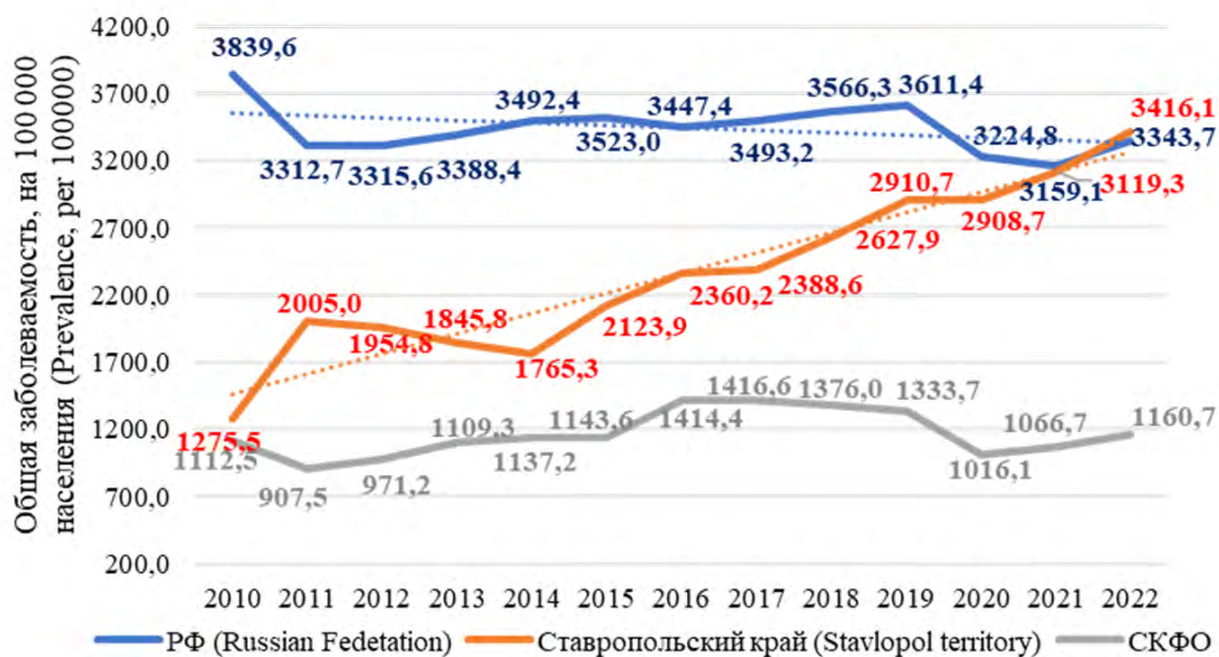


Рис. 3. Динамика показателя общей заболеваемости ЦВБ сельских жителей в целом по РФ и по Ставропольскому краю в 2010–2022 гг.

Fig. 3. Dynamics of the overall incidence of CVD among rural residents in the Russian Federation as a whole and in the Stavropol Territory in 2010–2022

Среди всех ЦВБ наибольшее по своим последствиям значение имеют внутрочерепные, внутримозговые кровоизлияния и инфаркты мозга. При этом следует учесть, что на заболеваемость ими существенное влияние оказывает возраст населения, в связи с чем следует рассматривать динамику показателя первичной заболеваемости ими, представленную на рисунке 4.

Первичная заболеваемость инсультами сельского населения Ставропольского края снижалась несколько быстрее, чем в целом по РФ (коэффициент регрессии составил $-2,8$ и $-0,1$, соответственно). Это косвенно указывает на результативность профилактики всех видов инсультов: как инфарктов мозга, так и геморрагических инсультов.

Динамика показателя заболеваемости геморрагическим, неуточнённым инсультами и инфарктом мозга представлена на рис. 5.

Снижение заболеваемости неуточнёнными инсультами в Ставропольском крае шло быстрее,

чем в целом по РФ (коэффициенты уравнений регрессии составили $-4,4$ и $-3,9$, соответственно). Заболеваемость неуточнёнными инсультами перераспределялась между инфарктами мозга и геморрагическими инсультами, что существенно влияло на их динамику, что, в частности, привело к росту первичной заболеваемости инфарктами мозга, который, однако, в Ставропольском крае рос медленнее, чем в целом по РФ (коэффициенты уравнений регрессии составили $2,5$ и $4,3$, соответственно). Заболеваемость геморрагическими инсультами в Ставропольском крае продолжала снижаться, причём более быстрыми темпами, чем в целом по РФ (коэффициенты уравнений регрессии составили $-1,4$ и $-0,5$, соответственно).

Важными показателями, отражающими организацию помощи при ЦВБ (в том числе — сельскому населению), является смертность от ЦВБ и летальность от ЦВБ (рисунок 6).

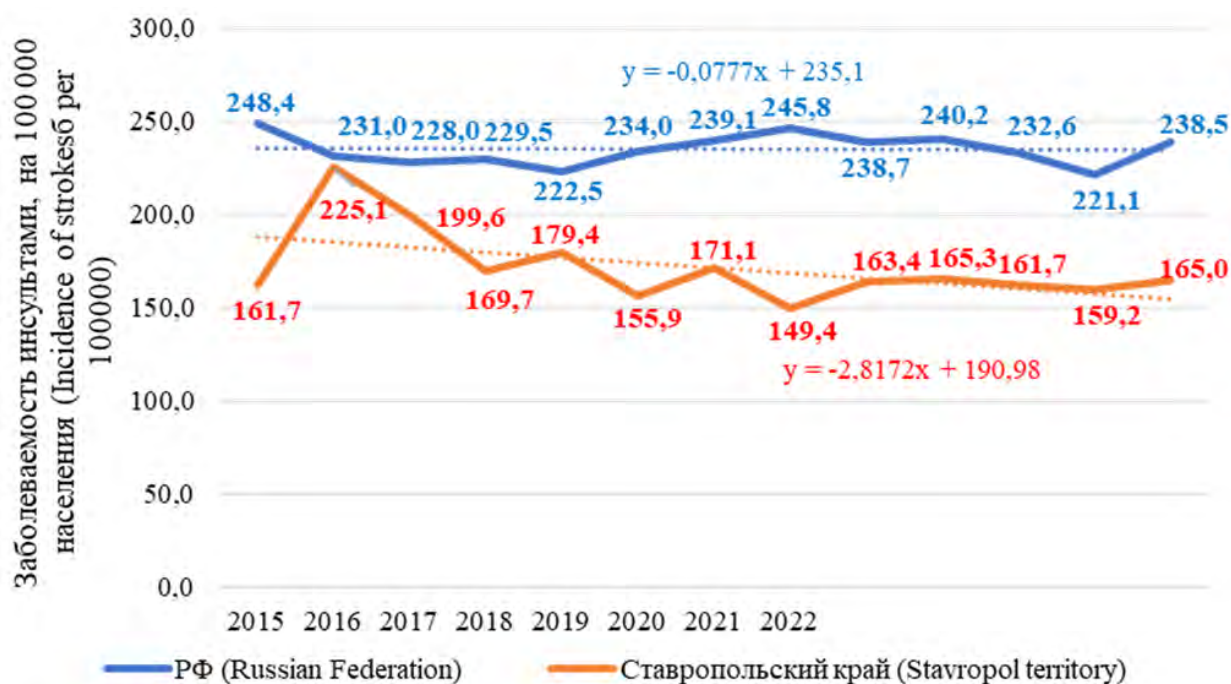


Рис. 4. Динамика показателя первичной заболеваемости сельского населения инсультами (геморрагическими, инфарктами мозга и неуточнёнными как кровоизлияние или инфаркт) в целом по РФ и Ставропольскому краю в 2010–2022 гг.

Fig. 4. Dynamics of the rate of primary incidence of strokes in the rural population (hemorrhagic, cerebral infarctions and unspecified as hemorrhage or heart attack) in the whole of the Russian Federation and the Stavropol Territory in 2010–2022

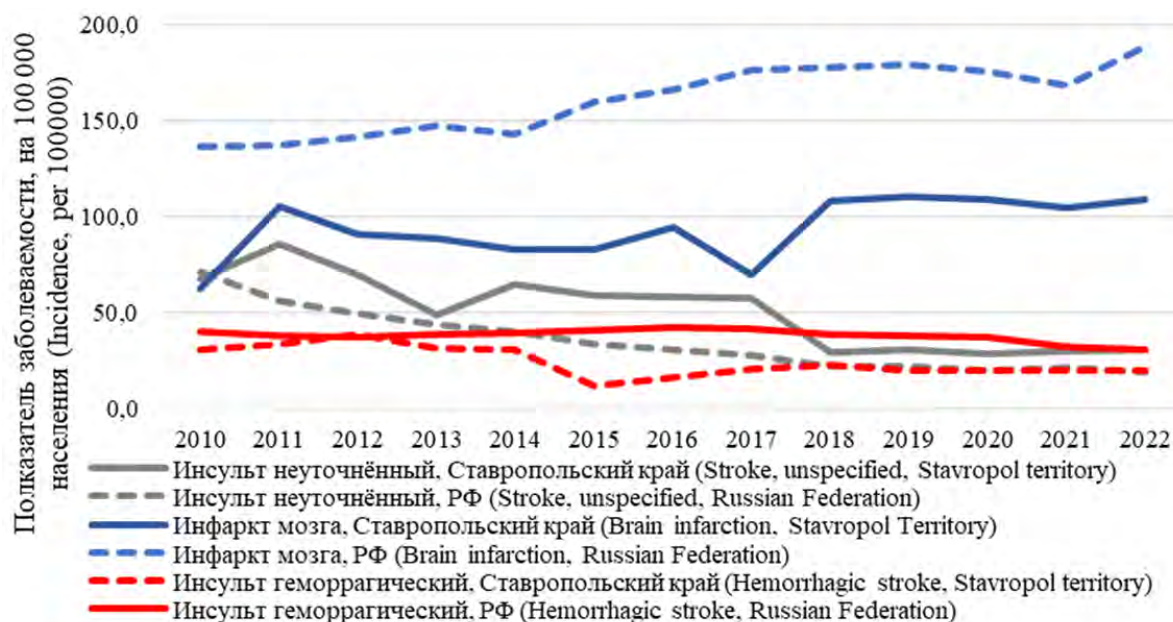


Рис. 5. Динамика показателя заболеваемости сельского населения геморрагическим, неуточнённым инсультами и инфарктом мозга в целом по РФ и Ставропольскому краю в 2010–2022 гг.

Fig. 5. Dynamics of the incidence of hemorrhagic, unspecified strokes and cerebral infarction in the rural population as a whole in the Russian Federation and the Stavropol Territory in 2010–2022

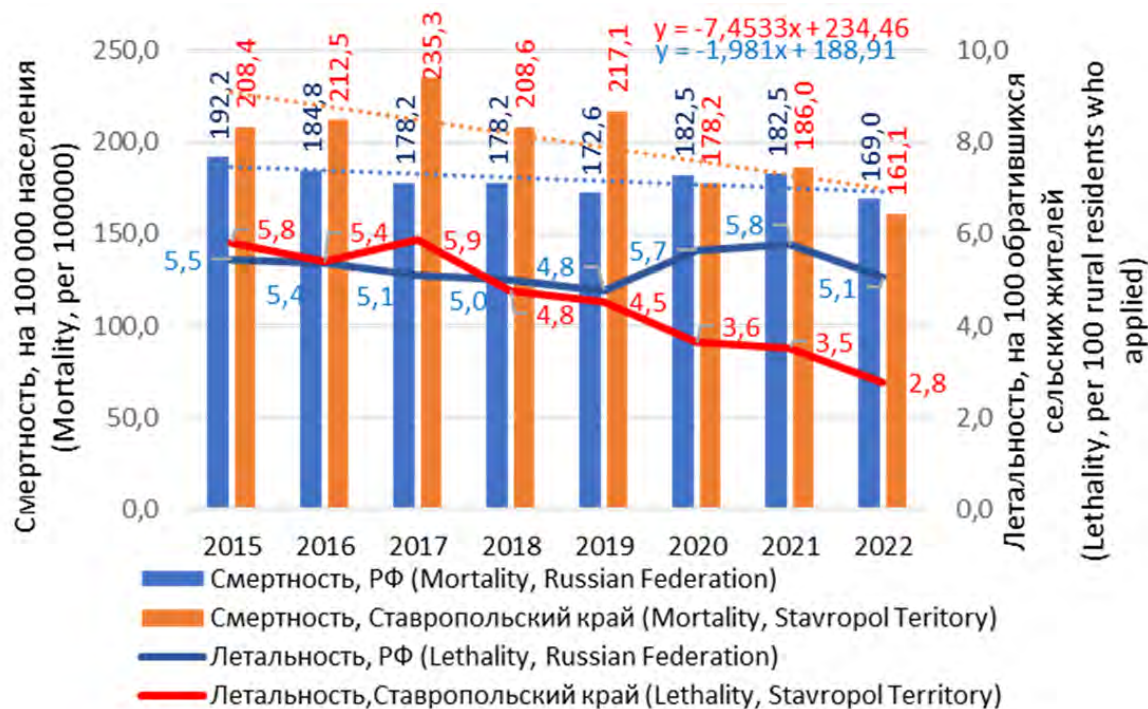


Рис. 6. Смартность от ЦВБ (на 100 000 населения) и летальность от ЦВБ (на 100 обратившихся в медицинские организации в течение года) сельского населения Российской Федерации и Ставропольского края с 2015 по 2022 гг.

Fig. 6. Mortality from CVD (per 100,000 population) and mortality from CVD (per 100 people who applied to medical organizations during the year) of the rural population of the Russian Federation and Stavropol Territory from 2015 to 2022

В 2020–2021 гг. отмечается существенное снижение смертности от ЦВБ в Ставропольском крае, в то время как в целом по РФ показатель оставался относительно постоянным (коэффициенты уравнения регрессии $-7,5$ и $-2,0$, соответственно). Показатель летальности от ЦВБ в целом по РФ не менялся, в то время, как в Ставропольском крае он, начиная с 2018 года, снижался. Между показателем летальности и показателем смертности сельского населения от цереброваскулярной болезни имеется сильная корреляционная связь ($r = 0,9$; $p = 0,002$).

Наиболее существенно снизилась летальность сельского населения Ставропольского края от внутримозговых и других внутричерепных кровоизлияний (с 292,4 в 2015 г. до 125,8 в 2021 г). Летальность от субарахноидальных кровоизлияний и инфаркта мозга изменялась статистически малозначимо.

С одной стороны, заболеваемость характеризует распространённость заболеваний в популяции, с другой стороны — доступность оказания

медицинской помощи, в том числе — профилактической [16].

Тенденция к росту показателей первичной и, особенно, общей заболеваемости ЦВБ связана с улучшением выявления случаев ЦВБ среди сельского населения, а также ростом контингентов больных. Наряду с этим, данное явление в значительной мере связано с процессами старения населения Края [17]. Однако рост стандартизованного показателя общей заболеваемости ЦВБ свидетельствует о том, что наряду с процессами старения населения Ставропольского края, идёт накопление контингентов пациентов, выживших после ЦВБ, что соотносится со снижением показателя смертности от ЦВБ (см. ниже).

Быстрое снижение неуточнённых инсультов среди сельского населения Ставропольского края связано с оснащением медицинских организаций компьютерными томографами (в том числе — в рамках Программы) и обучением специалистов. Аналогичные процессы отмечались и в целом по России, однако го-

раздо медленнее; доступность современной качественной диагностики для них увеличивалась медленнее, чем в Ставропольском крае. Это привело к тому, что в Ставропольском крае продолжился рост заболеваемости сельского населения инфарктами мозга, однако темп его был ниже, чем в целом по РФ. Во многом это связано с тем, что программа по борьбе с факторами риска ишемических инсультов (как составная часть мероприятий краевой программы «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае») оказалась более результативной, чем аналогичные программы в целом по РФ. Также быстро снижались и геморрагические инсульты, что связано с воздействием на факторы их развития, в первую очередь — контроль над артериальной гипертензией и со снижением употребления алкоголя [18]. Если в 2008 г психотические расстройства, связанные с употреблением алкоголя (алкогольные психозы), синдром зависимости от алкоголя составляли 55,6 на 100 000 населения, то к 2016 г. они снизились до 34,2, а к 2021 г. — до 16,4 на 100 000 населения [19–21].

Развитие здоровьесберегающих технологий, совершенствование профилактики и системы оказания медицинской помощи и медико-социальной реабилитации больных с ЦВБ направлено на снижение преждевременной смертности и увеличение ожидаемой продолжительности жизни [16]. Наиболее выраженное влияние реализации программы в Ставропольском крае отмечено на показатель летальности от ЦВБ. Не в последнюю очередь это связано со снижением смертности и летальности от внутримозговых и других внутричерепных кровоизлияний; по данным А.Н. Гурова и соавт. [21], госпитальная летальность от них среди всего населения Московской области составляла 53,3 %. Летальность сельского населения Ставропольского края от внутримозговых и других внутричерепных кровоизлияний снизилась от 292,4 до 127,6 на 100 обратившихся по поводу данной патологии в отчётном году (данная цифра включает в себя также и не госпитализированных пациентов в т.ч. выявленных посмертно).

Следует также отметить, что пандемия COVID-19 не привела в Ставропольском крае к росту

летальности от cerebrovascularных болезней. Мы связываем это с предупреждением данного явления путём открытия специализированных отделений для лечения пациентов с болезнями системы кровообращения, сочетанными с COVID-19, в которых пациентам с COVID-19 назначалась адекватная терапия, предотвращающая последующие осложнения, связанные с гиперкоагуляцией.

Выводы

Реализация программы по борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае привела к росту выявления cerebrovascularных болезней среди сельского населения Ставропольского края, что сопровождалось снижением смертности и летальности от них (прежде всего от внутримозговых и других внутричерепных кровоизлияний). Создание специализированных отделений для лечения пациентов с болезнями системы кровообращения, сочетанными с COVID-19 позволило предотвратить рост смертности от cerebrovascularных болезней в период пандемии COVID-19. Предлагаемый комплекс мероприятий по борьбе с cerebrovascularными болезнями, включающий профилактические мероприятия, систему социальной мобилизации, FAST-теста, системы маршрутизации пациентов с доставкой подлежащих лиц в сосудистые центры в течение часа, своевременного реагирования на новые факторы риска развития ЦВБ может быть рекомендован к повсеместному внедрению в территориях со сходной структурой населения.

Библиографический список

1. Муравьёва А.А., Михайлова Ю.В., Стерликов С.А. Особенности заболеваемости cerebrovascularными болезнями в Ставропольском крае в контексте реализации краевой программы «борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае» // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2023. № 3. С. 903–929. doi:10.24412/2312-2935-2023-3-903-929
2. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019. N. 157. P. 107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843
3. Гафурова Д.У. Церебральные инсульты и их особенности у сельских жителей Республики Дагестан: дисс ... кандидата меди-

цинских наук: 14.01.11. Санкт-Петербург; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России. Санкт-Петербург, 2019. 156 с.

4. Былина С.Г. Смертность городского и сельского населения РФ по причинам смерти: сравнительный анализ // Международный научно-исследовательский журнал. 2020. № 10. Т. 100. С. 95–103. doi: 10.23670/IRJ.2020.100.10.054

5. Зубко А.В., Сабгайда Т.П., Семенова В.Г., Музыкантова Н.Н. Потери российского населения от предотвратимых причин сердечно-сосудистой смертности в периоды до и во время пандемии // Социальные аспекты здоровья населения. 2023. № 69. Т. 1. doi: 10.21045/2071-5021-2023-69-1-6

6. Wu S., Wu B., Liu M., Chen Z., Wang W., Anderson C.S., Sandercock P., Wang Y., Huang Y., Cui L., Pu C., Jia J., Zhang T., Liu X., Zhang S., Xie P., Fan D., Ji X., Wong K.L., Wang L. China Stroke Study Collaboration. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management // *Lancet Neurol*. 2019. № 4. С. 394–405. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30500-3

7. Jackson S.M., Neibling B.A., Barker R.N. Stroke survivors' perspectives on recovering in rural and remote Australia: A systematic mixed studies review // *Aust Occup Ther J*. 2022. № 69. Т. 2. С. 214–230. doi: 10.1111/1440-1630.12779

8. Leira E.C., Hess D.C., Torner J.C., Adams H.P. Jr. Rural-urban differences in acute stroke management practices: a modifiable disparity // *Arch Neurol*. 2008. № 65. Т. 7. С. 887–91. doi: 10.1001/archneur.65.7.887

9. Ермолаев Д.О., Ермолаева Ю.Н. Региональные особенности смертности от болезней системы кровообращения в контексте региональной программы по снижению сердечно-сосудистой смертности // *Медико-фармацевтический журнал Пульс*. 2021. № 23. Т. 8. С. 21–27.

10. Ключихина О.А., Шпрах В.В., Стаховская Л.В., Полунина Е.А. Анализ среднесноголетней заболеваемости и смертности от инсульта в регионах Российской Федерации, вошедших в федеральную программу реорганизации помощи пациентам с инсультом // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2020. № 122. Т. 120. С. 3741.

11. Об утверждении краевой программы «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями в Ставропольском крае». Постановление Правительства Ставропольского края от 25 июня 2019 г. № 277-п. Режим доступа: <https://shpakrb.ru/files/ZAKON/Regionalnoe/2020/277-p.pdf> (Дата обращения: 24.07.2023).

12. Lou M., Yuan D., Liao S., Tong L., Li J. Potential mechanisms of cerebrovascular diseases in COVID-19 patients // *J. Neurovirol*. 2021. № 1. Т. 27. С. 35–51. doi: 10.1007/s13365-021-00948-2

13. Tsivgoulis G., Palaiodimou L., Zand R., Lioutas V.A., Krogias C., Katsanos A.H., Shoamanesh A., Sharma V.K., Shahjouei S., Baracchini C., Vlachopoulos C., Gournellis R., Sfikakis P.P., Sandset E.C., Alexandrov A.V., Tsioufas S. COVID-19 and cerebrovascular diseases: a comprehensive overview // *Ther Adv Neurol Disord*. 2020;13:1756286420978004. doi: 10.1177/1756286420978004

14. Stein L.K., Mayman N.A., Dhamoon M.S., Fifi J.T. The emerging association between COVID-19 and acute stroke // *Trends Neurosci*. 2021. № 7. Т. 44. С. 527–537. doi: 10.1016/j.tins.2021.03.005

15. Белозеров В.С., Щитова Н.А., Турун П.П., Эшироков В.М., Панин А.Н. Ставропольский край. Социальный портрет региона.

Социальный атлас российских регионов. Режим доступа: <http://www.ecoross.ru/files/atlas/stavr.shtml> (Дата обращения: 01.07.2023).

16. Бызов Н.С., Ножкина Н.В. Современные вопросы медико-демографических последствий здоровьесбережения при цереброваскулярных болезнях // Сборник статей IX Уральского демографического форума. Екатеринбург: Институт экономики УрО РАН. Екатеринбург. 2018. 505 с.

17. Доклад о состоянии и тенденциях демографической ситуации в Ставропольском крае. Ставрополь: Министерство труда и социальной защиты населения Ставропольского края. Бюро новостей, 2018. 76 с.

18. Мухаметзянов А.М. Заболеваемость цереброваскулярными болезнями по данным обращаемости населения г. Уфы // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=13095> (Дата обращения 25.08.2023)

19. Социально значимые заболевания населения России в 2009 году (Статистические материалы). М.: ЦНИИОИЗ. 2010. 66 с.

20. Какорина Е.П., Стародубов В.И., Александрова Г.А., Поликарпов А.В., Голубев Н.А., Огрызко Е.В., Кадулина Н.А., Беляева И.М., Авдеева Л.Н., Семенова Т.А., Обломова М.В., Пронина Т.В. Социально значимые заболевания населения России в 2009 году (Статистические материалы). М.: ЦНИИОИЗ Минздрава России. 2010. 64 с.

21. Котова Е.Г., Кобякова О.С., Стародубов В.И., Александрова Г.А., Голубев Н.А., Кучерявая Д.А., Огрызко Е.В., Поликарпов А.В., Шеленова Е.А. Социально-значимые заболевания населения России в 2021 году (Статистические материалы). М.: ЦНИИОИЗ Минздрава России, 2022. 78 с.

22. Гуров А.Н. Уровень заболеваемости цереброваскулярными болезнями, летальности и смертности в Московской области в 2014 г. // Альманах клинической медицины. 2015. № 39. С. 11–14.

References

1. Murav'eva AA, Mikhaylova YuV, Sterlikov SA. Features of the incidence of cerebrovascular diseases in the Stavropol Territory in the context of the implementation of the regional program «fighting cardiovascular diseases in the Stavropol Territory». *Modern problems of health care and medical statistics*. 2013;(3): 903–929. doi:10.2441/2/2312-2935-2023-3-903-929

2. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9 th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843

3. Gafurova DU. Cerebral strokes and their features in rural residents of the Republic of Dagestan. PhD Thesis. Saint Petersburg; National Medical Research Center named after V.A. Almazov, Russia, 2019. 156 p. (In Russian).

4. Bylina SG. Mortality of the urban and rural population of the Russian Federation by cause of death: a comparative analysis. *International Scientific Research Journal*. 2020;10(100):95–103. doi: 10.23670/IRJ.2020.100.10.054 (In Russian).

5. Zubko AV, Sabgayda TP, Semenova VG, Muzykantova NN. Losses of the Russian population from preventable causes of cardiovascular mortality in the periods before and during the pandemic.

Social aspects of public health. 2023;69(1). doi: 10.21045/2071-5021-2023-69-1-6 (In Russian).

6. Wu S, Wu B, Liu M, Chen Z, Wang W, Anderson CS, Sandercock P, Wang Y, Huang Y, Cui L, Pu C, Jia J, Zhang T, Liu X, Zhang S, Xie P, Fan D, Ji X, Wong KL, Wang L. China Stroke Study Collaboration. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management. *Lancet Neurol*. 2019;18(4):394–405. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30500-3

7. Jackson SM, Neibling BA, Barker RN. Stroke survivors' perspectives on recovering in rural and remote Australia: A systematic mixed studies review. *Aust Occup Ther J*. 2022;69(2):214–230. doi: 10.1111/1440-1630.12779

8. Leira EC, Hess DC, Torner JC, Adams HP Jr. Rural-urban differences in acute stroke management practices: a modifiable disparity. *Arch Neurol*. 2008;65(7):887–91. doi: 10.1001/archneur.65.7.887

9. Ermolaev DO, Ermolaeva Yu N. Regional features of mortality from diseases of the circulatory system in the context of a regional program to reduce cardiovascular mortality. *Medical and pharmaceutical journal Pulse*. 2021;23(8):21–27 (In Russian).

10. Klochikhina OA, Shprakh VV, Stakhovskaya LV, Polunina EA. Analysis of the average long-term morbidity and mortality from stroke in the regions of the Russian Federation included in the federal program for the reorganization of care for patients with stroke. *Journal of Neurology and Psychiatry. S.S. Korsakov. Special Issues*. 2020;120(122):3741. (In Russian).

11. On the approval of the regional program «Fight against cardiovascular diseases in the Stavropol Territory». Decree of the Government of the Stavropol Territory dated June 25, 2019 No. 277-p. URL: <https://shpakrb.ru/files/ZAKON/Regionalnoe/2020/277-p.pdf> (Cited: 01.07.2023) (In Russian).

12. Lou M, Yuan D, Liao S, Tong L, Li J. Potential mechanisms of cerebrovascular diseases in COVID-19 patients. *J. Neurovirol*. 2021;27(1):35–51. doi: 10.1007/s13365-021-00948-2

13. Tsvigoulis G, Palaiodimos L, Zand R, Lioutas VA, Krogias C, Katsanos AH, Shoamanesh A, Sharma VK, Shahjouei S, Baracchini C, Vlachopoulos C, Gournellis R, Sfikakis PP, Sandset EC, Alexandrov AV, Tsioudras S. COVID-19 and cerebrovascular diseases: a comprehensive

overview. *Ther Adv Neurol Disord*. 2020;13:1756286420978004. doi: 10.1177/1756286420978004. (In Russian).

14. Stein LK, Mayman NA, Dhamoon MS, Fifi JT. The emerging association between COVID-19 and acute stroke. *Trends Neurosci*. 2021 Jul;44(7):527–537. DOI: 10.1016/j.tins.2021.03.005

15. Belozero V, Shhitova NA, Turun PP, Jeshrokov VM, Panin AN. Stavropol region. Social portrait of the region // Social atlas of Russian regions. <http://www.eoross.ru/files/atlas/stavr.shtml> (Cited: 01.07.2023) (In Russian).

16. Byzov NS, Nozhkina NV. Modern issues of medical and demographic consequences of health conservation in cerebrovascular diseases. *Collection of articles of the IX Ural Demographic Forum. Ekaterinburg: Institute of Economics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*. Ekaterinburg. 2018: 494–505 (In Russian).

17. Report on the state and trends of the demographic situation in the Stavropol Territory. Ministry of Labor and Social Protection of the Population of the Stavropol Territory. Stavropol. 2018: 76 p. (In Russian).

18. Mukhametzhanov AM. Incidence of cerebrovascular diseases according to the population of Ufa/Modern problems of science and education. *Modern problems of science and education*. 2014;(3). <https://science-education.ru/ru/article/view?id=13095>. (Cited 25.08.2023) (In Russian).

19. Socially significant diseases of the Russian population in 2009 (Statistical materials). M.: TsNII OIZ, 2010. 66 p. (In Russian).

20. Kakorina EP, Starodubov VI, Aleksandrova GA, Polikarpov AV, Golubev NA, Ogryzko EV, Kadulina NA, Belyaeva IM, Avdeeva LN, Semenova TA, Oblomova MV, Pronina TV. Socially significant diseases of the Russian population in 2009 (Statistical materials). M.: TsNII OIZ Minzdrava Rossii. 2010. 64 p. (In Russian).

21. Kotova EG, Kobayakova OS, Starodubov VI, Aleksandrova GA, Golubev NA, Kucheryavaya DA, Ogryzko EV, Polikarpov AV, Shelepova EA. Socially significant diseases of the Russian population in 2021 (Statistical materials). M.: TsNII OIZ Minzdrava Rossii, 2022. 78 p. (In Russian).

22. Gurov AN. The incidence rate of cerebrovascular diseases, mortality and mortality in the Moscow region in 2014. *Almanac of Clinical Medicine*. 2015;39:11–14. (In Russian).

Ответственный за переписку: Муравьева Алла Анатольевна — кандидат медицинских наук, декан факультета довузовского образования, доцент кафедры анестезиологии, реаниматологии с курсом ДПО, ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Российская Федерация, 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310. E-mail: Muravyeva81@mail.ru

Муравьева А.А. ORCID 0000–0002–4460–870X

Абрамов А.Ю. SPIN 761060; ORCID 0000–0001–7178–1260.

Михайлова Ю.В. ORCID 0000–0001–6779–726X

Стерликов С.А. ORCID 0000–0001–8173–8055

Corresponding author: Muravyeva Alla Anatolyevna — PhD, MD, Dean of the Faculty of Pre-University Education, Associate Professor of the Department of Anesthesiology and Reanimatology with a course of additional vocational training, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Stavropol State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 355017, Stavropol, st. Mira, 310. Russian Federation. E-mail: Muravyeva81@mail.ru

Muravyeva A.A. ORCID 0000–0002–4460–870X

Abramov A. Yu. ORCID 0000–0001–7178–1260

Mikhailova Yu.V. ORCID 0000–0001–6779–726X

Sterlikov S.A. ORCID 0000–0001–8173–8055



DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-496-514
EDN: IPEVRA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Выбор параметров и показателей клинических центров при прогнозировании набора пациентов для клинических исследований

С.С. Милованов 

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Российская Федерация
✉ milovanovss@gmail.com

Аннотация. *Актуальность.* Набор пациентов и его соответствие протоколу клинического исследования является одной из основных целей проведения исследования осуществимости перед стартом любого клинического исследования. Оценка физибильности исследования является обязательным перед стартом любого международного многоцентрового клинического исследования, и одна из основных ее целей — это поиск клинических центров с подходящим пулом пациентов для последующего их отбора и прогнозирования набора пациентов согласно требованиям протокола. Качественно проведенная физибильность — это клинические центры, набирающие валидных пациентов с соблюдением рамок протокола и предложенных центрами цифр набора. После проведения оценки физибильности прогноз набора пациентов должен совпадать с предугаданием набора пациентов протокола. Однако, более половины международных многоцентровых клинических исследований завершаются неудачей из-за неуспешного набора пациентов. Широко применяемый метод при оценке физибильности — опросный, и причинами последующих неудач в клиническом исследовании, может являться, как недооценка предоставленной информации в опросниках, так и отсутствие соответствующих параметров и показателей, и, как следствие, отбор неподходящих клинических центров. Подверженность к субъективности мнения в селекции сайтов также приводит к некачественному отбору сайтов и, следовательно, актуальность в объективной и независимой оценке сохраняется. *Цель исследования:* проанализировать набор пациентов в отобранных клинических исследованиях; выявить связанные с набором параметры и показатели; найти статистически достоверную связь с успешным набором у проанализированных параметров и показателей. *Материалы и методы.* Проведен ретроспективный анализ 4 международных мультицентровых клинических исследований II–III фаз по набору пациентов. Критерием для отбора являлся успешный набор пациентов. *Статистический анализ:* описательная статистика, многофакторный анализ, корреляционный анализ. *Результаты и обсуждение.* Найдены параметры и показатели, показавшие сильную статистическую корреляционную связь с успешным набором пациентов в клинических центрах. В результате исследования сделаны выводы о необходимости расширения использования параметров и соотношения параметров: вместо показателей одного параметра — предполагаемый набор пациентов до включения в обязательную оценку сайтов расчетный параметр,

© Милованов С.С., 2023



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

необходимо дополнительно учитывать также следующие параметры: тип сайта и время первичного отклика в днях. **Выводы.** Использование предложенных параметров и показателей уменьшит вероятность неудачи в наборе пациентов. Данные параметры позволят оценивать клинические центры с прогнозированием набора пациентов и отбирать более качественно клинические центры.

Ключевые слова: отбор сайтов, набор пациентов, успешный рекрутмент, клинические исследования

Информация о финансировании. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования.

Вклад авторов. Разработка концепции, формулировка основных идей и задач, сбор данных, интерпретация результатов — С.С. Милованов.

Информация о конфликте интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность рецензентам статьи.

Этическое утверждение — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 08.09.2023. Принята 09.10.2023.

Для цитирования: *Милованов С.С.* Выбор параметров и показателей клинических центров при прогнозировании набора пациентов для клинических исследований // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 496–514. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-496-514

Parameters and indicators selection of clinical centers in predicting the patients enrollment for clinical trials

Svyatoslav S. Milovanov 

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

✉ milovanovss@gmail.com

Abstract. Relevance. Recruitment of patients and its compliance with the clinical trial protocol is one of the main goals of conducting a feasibility study before starting any clinical trial. Study feasibility is a must before starting any international multicentre clinical trial, and one of the main goals of feasibility is to find clinical centers with a suitable pool of patients for their subsequent selection and prediction of patient recruitment according to protocol requirements. Well-conducted fitness is clinical centers that recruit eligible patients in compliance with the protocol framework and the recruitment numbers proposed by the centers. After conducting fability, the patient recruitment prediction coincides with the protocol patient recruitment prediction. However, more than half of international multicenter clinical trials fail due to unsuccessful patient recruitment. A widely used method in the study of feasibility is a questionnaire and the reasons for subsequent failures in a clinical trial can be both an underestimation of the information provided in the questionnaires, and the lack of appropriate parameters and indicators, and, as a result, the selection of inappropriate clinical centers. Exposure to the subjectivity of opinion in the selection of sites also leads to poor selection of sites and, therefore, relevance in an objective and independent assessment remains. *The aim of the study* was to analyze the set of patients in selected clinical trials, identify set-related parameters and measures, and find a statistically significant relationship with a successful set of analyzed parameters and measures. *Materials and Methods:* A retrospective analysis of 4

international multicenter clinical trials of II–III phases was carried out for the recruitment of patients. The selection criterion is a successful recruitment of patients. Statistical analysis: descriptive statistics, multivariate analysis, correlation analysis. *Results and Discussion.* Parameters and indicators were found that showed a strong statistical correlation with successful recruitment of patients in clinical centers. As a result of the study, conclusions were drawn about the need to expand the use of parameters and the ratio of parameters: instead of indicators of one parameter — the expected set of patients before inclusion in the mandatory assessment of sites is a calculated parameter, it is also necessary to additionally take into account the following parameters: type of site and initial response time in days. *Conclusions.* Using the proposed parameters and metrics will reduce the likelihood of failure in patient recruitment. These parameters will make it possible to evaluate clinical centers with a prediction of the number of patients and to select more qualitative clinical centers.

Keywords: site selection, patient recruitment, successful recruitment, clinical trials

Funding. The authors declare no external funding.

Author contributions. Development of the concept, formulation of the main ideas and tasks, data collection, interpretation of the results.

Conflict of interest statement: The author declares no conflict of interest.

Acknowledgments. The author expresses his deep gratitude to the reviewers of the article.

Ethics approval — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 08.09.2023. Accepted 09.11.2023.

For citation: Milovanov SS. Parameters and indicators selection of clinical centers in predicting the patients enrollment for clinical trials. *RUDN Journal of Medicine.* 2023;27(4):496–514. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–496–514

Введение

Золотой стандарт клинических исследований II–III фаз — это рандомизированные клинические исследования [1–4]. Также общепринятая практика в клинических исследованиях — проведение оценки физибильности перед стартом набора пациентов и одной из основных целей физибильности является выявление необходимого пула пациентов [5, 6] и, в свою очередь, барьер в наборе пациентов — это некачественно проведенная оценка физибильности [7]. Только два из тринадцати клинических исследований выполняют набор пациентов в запланированный по протоколу срок и авторами выявлена также большая неравномерность в распределении рандомизированных пациентов по клиническим центрам, участвующими в исследовании [5, 8, 9].

D. Hunninghake с коллегами прямо указывают на набор пациентов, как наиболее трудновыполнимую задачу любого клинического исследования [8].

Из существующих параметров, предоставляемых клиническим центром в отношении набора пациентов, главный исследователь на этапе оценки физибильности предоставляет количество предполагаемого набора пациентов, согласно требованиям GCP [10,11]. После проведения оценки физибильности селекция клинических центров в большинстве своем, основывается на субъективном факторе [12]. Поиск и расширение параметров, позволяющих спрогнозировать набор пациентов при выборе клинических центров, остается актуальной проблемой в клинических исследованиях.

Материалы и методы

Данные для анализа сгенерированы в 4 международных многоцентровых клинических исследованиях (ММКИ):

1. Рака головы и шеи — III фазы — (EudraCT — 2010-019952-35)
2. Рака легких — (EudraCT — 2011-001084-42)
3. Колоректального рака — (EudraCT — 2006-004214-41)
4. Идиопатической пурпуре. — (EudraCT — 2009-014842-28)

Все наблюдавшиеся клинические исследования завершены успешно по набору пациентов, и это явилось критерием отбора выбранных ММКИ для изучения факторов.

Результаты набора пациентов и связанные с набором данные получены из клинических центров России, Украины и Белоруссии, а также для анализа включены основные результаты набора по всем принимавшему участие клиническим центрам.

Всего набрано 622 пациента из 70 клинических центров, расположенных в 59 городах региона России, Украины, Белоруссии. Общее количество вовлеченных пациентов по всему миру — 1919.

Статистический Анализ

Использованы методы описательной статистики — рассчитаны минимум и максимум значений, стандартное отклонение, средние значения, медиана, мода, коэффициент вариации, доверительный интервал для параметров и показателей до и после завершения набора пациентов:

1. Тип сайта, предложенный для оценки набора:

По фактической скорости набранных пациентов мы провели типирование и выделили 4 группы (типы сайтов):

- «молчащие» сайты — со скоростью набора — 0 рандомизированных пациентов (скрининг возможен) в месяц (тип 1);
- низкорекрутинговые — скорость набора от 0,01 до 0,19 пациентов в месяц, то есть 1 пациент за пять месяцев (тип 2);

- среднерекрутинговые — скорость набора от 0,20 до 0,89 пациентов в месяц, то есть 1 пациент за 5–1,4 месяца (тип 3);
- высокорекрутинговые — скорость набора от 0,90 до 3 пациентов в месяц, то есть 1 пациент за 1,1–0,3 месяца (тип 4).

2. Параметр времени ответа клинического центра на отосланный по электронной почте адрес главного исследователя (в днях).

3. Параметр — планируемое количество пациентов — это план набора спрогнозированный главным исследователем на этапе поиска клинических центров для проведения клинического исследования.

4. Параметр — период рекрутмента (в днях) — период времени от активации сайта до последнего набранного пациента.

5. Параметр — финальная скорость набора пациентов.

6. Параметр — набранное количество пациентов в клиническом центре.

7. Параметр — время первого скрининга.

8. Параметр — опыт исследователя в клинических исследованиях в годах.

9. Показатель — отношения параметров — отношение времени отклика к предполагаемому набору пациентов.

10. Показатель отношение параметра времени первого скрининга ко времени первого отклика.

11. Показатель отношение предполагаемого набора пациентов/таргетный набор пациентов.

12. Параметры впервые выявленной заболеваемости и распространенности болезни. Для расчета показателей распространенности использовались данные Росстата о среднегодовой численности населения субъектов Российской Федерации за 2010–2020 гг.

Результаты и обсуждение

Проанализированы общие статистические значения: численность населения и расчетное значение распространенности заболеванием в России, Украине, Белоруссии (Таблица 1, 2) [13, 14].

Таблица 1

Население России, Украины, Белоруссии в 2000–2020 гг.

№	Страна	Население
1	Россия	145690635,5
2	Украина	44955750
3	Белоруссия	9474000

Table 1

Total number of residents in in Russia, Ukraine, Belarus in 2000–2020

№	Country	Number of residents
1	Russia	145690635.5
2	Ukraine	44955750
3	Belorussia	9474000

Таблица 2

Абсолютная заболеваемость в России, Украине и Белоруссии (на основании заболеваемости на сто тысяч населения в год) по раку головы и шеи, раку легких, колоректальному раку и идиопатической пурпуре

№	Страна	Рак головы и шеи	Рак легких	Колоректальный рак	Идиопатическая пурпура с диагнозом – хроническая персистирующая ИТП
1	Россия	13500	62000	29918	100
2	Украина	3000	19330	8500	100
3	Белоруссия	1514	2430	3400	50

Примечание: * Протокол по ИТП включал пациентов с диагнозом хроническая персистирующая ИТП и таких пациентов было уменьшенное количество; ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура.

Table 2

Absolute Incidence in Russia, Ukraine and Belarus (based on incidence per hundred thousand population per year) for head and neck cancer, lung cancer, colorectal cancer and idiopathic purpura

№	Country	Head and neck cancer	Lung cancer	Colorectal cancer	Idiopathic purpura with a diagnosis of chronic persistent ITP*
1	Russia	13500	62000	29918	100
2	Ukraine	3000	19330	8500	100
3	Belorussia	1514	2430	3400	50

Note: * The ITP protocol included patients diagnosed with chronic persistent ITP and there were a reduced number of such patients; ITP – idiopathic thrombocytopenic purpura.

Доступность целевой популяции пациентов определялась по распространенности заболевания в локализации открытия центра [6, 9, 15, 16]. Расчет-

ная распространенность заболевания представлена в таблице 3.

Таблица 3

Общее количество проживающих в городе открытия клинического центра по уровню распространенности нозологии по регионам и городам открытия центра

	Город	Код исследования	Страна	Нозология	Население в 2010 году	Заболеваемость нозологией протокола в год на сто тысяч населения
1	Санкт-Петербург	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5391203	500
2	Москва	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	10430000	1018
3	Сочи	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	364171	34
4	Курск	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	1 100 248	102
5	Витебск	CS001P3	Белоруссия	Рак головы и шеи	347900	57
6	Минск	CS001P3	Белоруссия	Рак головы и шеи	1836800	305
7	Санкт-Петербург	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5391203	500
8	Екатеринбург	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	4 300 374	398
9	Омск	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	1 915 170	177
10	Луцк	STA9090	Украина	Рак легких	213950	92
11	Тула	STA9090	Россия	Рак легких	496656	202
12	Владивосток	STA9090	Россия	Рак легких	598927	255
13	Донецк	STA9090	Россия	Рак легких	987000	411
14	Пенза	STA9090	Россия	Рак легких	519948	221
16	Киев	STA9090	Украина	Рак легких	2758000	1199
17	Челябинск	STA9090	Россия	Рак легких	1150000	489
18	Санкт-Петербург	STA9090	Россия	Рак легких	5391203	2294
19	Москва	STA9090	Россия	Рак легких	10430000	4914
20	Запорожье	STA9090	Россия	Рак легких	746749	321
21	Санкт-Петербург	STA9090	Россия	Рак легких	5391203	2294
22	Сочи	STA9090	Россия	Рак легких	364171	155
23	Нижний Новгород	STA9090	Россия	Рак легких	1257000	541
24	Сумы	STA9090	Украина	Рак легких	292139	123
25	Воронеж	STA9090	Россия	Рак легких	843531	385
26	Волгоград	STA9090	Россия	Рак легких	1019000	434
27	Ставрополь	STA9090	Россия	Рак легких	355914	164
28	Киев	STA9090	Украина	Рак легких	2758000	1199
29	Пятигорск	STA9090	Россия	Рак легких	144603	62
30	Кривой Рог	STA9090	Украина	Рак легких	695168	292
31	Самара	STA9090	Россия	Рак легких	1141000	490
32	Казань	STA9090	Россия	Рак легких	1169000	496
33	Харьков	STA9090	Украина	Рак легких	1419000	610
34	Москва	STA9090	Россия	Рак легких	10430000	4914
35	Днепропетровск	STA9090	Украина	Рак легких	966400	416

Окончание табл. 3

	Город	Код исследования	Страна	Нозология	Население в 2010 году	Заболеваемость нозологией протокола в год на сто тысяч населения
36	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10430000	2371
37	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	5391203	1107
38	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	5391203	1107
39	Донецк	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	987000	181
40	Барнаул	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	625 679	128
41	Черкассы	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	279 074	53
42	Екатеринбург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	4 300 374	883
43	Ярославль	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	597 161	123
44	Днепропетровск	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	966 400	183
45	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10430000	2257
46	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10430000	2371
47	Запорожье	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	746 749	141
48	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	5391203	1107
49	Тамбов	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	281 348	58
50	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	5391203	1107
51	Киев	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	2758000	527
52	Харьков	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	1419000	268
53	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10430000	2371
54	Нижний Новгород	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	1257000	261
55	Ижевск	SM101-201	Россия	ИТП	631182	0
56	Одесса	SM101-201	Украина	ИТП	993 120	2
57	Тула	SM101-201	Россия	ИТП	501629	0
58	Санкт-Петербург	SM101-201	Россия	ИТП	5391203	4
59	Днепропетровск	SM101-201	Украина	ИТП	966400	2
60	Киев	SM101-201	Украина	ИТП	2758000	6
61	Рязань	SM101-201	Россия	ИТП	526919	0
62	Краснодар	SM101-201	Россия	ИТП	715417	1
63	Электросталь	SM101-201	Россия	ИТП	156 136	0
64	Екатеринбург	SM101-201	Россия	ИТП	4300374	3
65	Нижний Новгород	SM101-201	Россия	ИТП	1257000	1
66	Харьков	SM101-201	Украина	ИТП	1419000	3
67	Сочи	SM101-201	Россия	ИТП	364171	0
68	Москва	SM101-201	Россия	ИТП	10430000	8
69	Саратов	SM101-201	Россия	ИТП	838 321	1
70	Черновцы	STA9090	Украина	Рак легких	241235	108

Примечание: ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура.

Table 3

Total number of people living in the city of opening of the clinical center, by the level of prevalence of nosology by regions and cities of the opening of the center

	City	Study	Country	Nosology	Population in 2010	The incidence of protocol nosology per year per hundred thousand population
1	Saint Petersburg	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5391203	500
2	Moscow	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	10430000	1018
3	Sochi	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	364171	34
4	Kursk	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	1 100 248	102
5	Vitebsk	CS001P3	Belorussia	Head and neck cancer	347900	57
6	Minsk	CS001P3	Belorussia	Head and neck cancer	1836800	305
7	Saint Petersburg	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5391203	500
8	Ekaterinburg	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	4 300 374	398
9	Omsk	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	1 915 170	177
10	Lutsk	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	213950	92
11	Tula	STA9090	Russia	Lungs' cancer	496656	202
12	Vladivostok	STA9090	Russia	Lungs' cancer	598927	255
13	Donetsk	STA9090	Russia	Lungs' cancer	987000	411
14	Penza	STA9090	Russia	Lungs' cancer	519948	221
16	Kyiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	2758000	1199
17	Chelyabinsk	STA9090	Russia	Lungs' cancer	1150000	489
18	Saint Petersburg	STA9090	Russia	Lungs' cancer	5391203	2294
19	Moscow	STA9090	Russia	Lungs' cancer	10430000	4914
20	Zaporozhye	STA9090	Russia	Lungs' cancer	746749	321
21	Saint Petersburg	STA9090	Russia	Lungs' cancer	5391203	2294
22	Sochi	STA9090	Russia	Lungs' cancer	364171	155
23	Nizhny Novgorod	STA9090	Russia	Lungs' cancer	1257000	541
24	Sumy	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	292139	123
25	Voronezh	STA9090	Russia	Lungs' cancer	843531	385
26	Volgograd	STA9090	Russia	Lungs' cancer	1019000	434
27	Stavropol	STA9090	Russia	Lungs' cancer	355914	164
28	Kyiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	2758000	1199
29	Pyatigorsk	STA9090	Russia	Lungs' cancer	144603	62
30	Krivoy Rog	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	695168	292
31	Samara	STA9090	Russia	Lungs' cancer	1141000	490
32	Kazan	STA9090	Russia	Lungs' cancer	1169000	496
33	Kharkiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	1419000	610
34	Moscow	STA9090	Russia	Lungs' cancer	10430000	4914
35	Dnepropetrovsk	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	966400	416

End of the table 3

	City	Study	Country	Nosology	Population in 2010	The incidence of protocol nosology per year per hundred thousand population
36	Moscow	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	10430000	2371
37	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	5391203	1107
38	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	5391203	1107
39	Donetsk	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	987000	181
40	Barnaul	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	625 679	128
41	Cherkasy	LSO-OL006	Ukraine	Colorectal cancer	279 074	53
42	Ekaterinburg	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	4 300 374	883
43	Yaroslavl	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	597 161	123
44	Dnepropetrovsk	LSO-OL006	Ukraine	Colorectal cancer	966 400	183
45	Moscow	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	10430000	2257
46	Moscow	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	10430000	2371
47	Zaporozhye	LSO-OL006	Ukraine	Colorectal cancer	746 749	141
48	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	5391203	1107
49	Tambov	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	281 348	58
50	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	5391203	1107
51	Kyiv	LSO-OL006	Ukraine	Colorectal cancer	2758000	527
52	Kharkiv	LSO-OL006	Ukraine	Colorectal cancer	1419000	268
53	Moscow	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	10430000	2371
54	Nizhny Novgorod	LSO-OL006	Russia	Colorectal cancer	1257000	261
55	Izhevsk	SM101-201	Russia	ITP	631182	0
56	Odessa	SM101-201	Ukraine	ITP	993 120	2
57	Tula	SM101-201	Russia	ITP	501629	0
58	Saint Petersburg	SM101-201	Russia	ITP	5391203	4
59	Dnepropetrovsk	SM101-201	Ukraine	ITP	966400	2
60	Kyiv	SM101-201	Ukraine	ITP	2758000	6
61	Ryazan	SM101-201	Russia	ITP	526919	0
62	Krasnodar	SM101-201	Russia	ITP	715417	1
63	Elektrostal	SM101-201	Russia	ITP	156 136	0
64	Ekaterinburg	SM101-201	Russia	ITP	4300374	3
65	Nizhny Novgorod	SM101-201	Russia	ITP	1257000	1
66	Kharkiv	SM101-201	Ukraine	ITP	1419000	3
67	Sochi	SM101-201	Russia	ITP	364171	0
68	Moscow	SM101-201	Russia	ITP	10430000	8
69	Saratov	SM101-201	Russia	ITP	838 321	1
70	Chernivtsi	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	241235	108

Note: ITP – idiopathic thrombocytopenic purpura.

Анализ таблицы показывает, что целевая популяция пациентов может отсутствовать в некоторых городах, в которых открыты клинические центры. Вероятно, субъективные причины повлияли на от-

крытие клинического центра и прежде всего это предполагаемый набор пациентов, предложенный на этапе оценки физибильности (таблица 4).

Таблица 4

Прогноз набора пациентов на этапе начала исследования (предполагаемый набор пациентов)

№	Город	Код исследования	Страна	Нозология	Планируемый набор пациентов
1	Москва	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
2	Сочи	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
3	Спб	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
4	Курск	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
5	Витебск	CS001P3	Белоруссия	Рак головы и шеи	12
6	Минск	CS001P3	Белоруссия	Рак головы и шеи	12
7	Санкт-Петербург	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
8	Омск	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
9	Екатеринбург	CS001P3	Россия	Рак головы и шеи	5
10	Челябинск	STA9090	Россия	Рак легких	12
11	Пенза	STA9090	Россия	Рак легких	6
12	Тула	STA9090	Россия	Рак легких	15
13	Санкт-Петербург	STA9090	Россия	Рак легких	12
14	Москва	STA9090	Россия	Рак легких	10
15	Сочи	STA9090	Россия	Рак легких	10
16	Санкт-Петербург	STA9090	Россия	Рак легких	12
17	Владивосток	STA9090	Россия	Рак легких	5
18	Донецк	STA9090	Россия	Рак легких	14
19	Черновцы	STA9090	Украина	Рак легких	15
20	Луцк	STA9090	Украина	Рак легких	15
21	Запорожье	STA9090	Россия	Рак легких	12
22	Киев	STA9090	Украина	Рак легких	13
23	Киев	STA9090	Украина	Рак легких	12
24	Волгоград	STA9090	Россия	Рак легких	18
25	Пятигорск	STA9090	Россия	Рак легких	12
26	Самара	STA9090	Россия	Рак легких	8
27	Нижний Новгород	STA9090	Россия	Рак легких	24
28	Воронеж	STA9090	Россия	Рак легких	14
29	Ставрополь	STA9090	Россия	Рак легких	10
30	Кривой Рог	STA9090	Украина	Рак легких	12
31	Сумы	STA9090	Украина	Рак легких	25
32	Киев	STA9090	Украина	Рак легких	15

Окончание табл. 4

№	Город	Код исследования	Страна	Нозология	Планируемый набор пациентов
33	Казань	STA9090	Россия	Рак легких	7
34	Харьков	STA9090	Украина	Рак легких	14
35	Москва	STA9090	Россия	Рак легких	10
36	Днепропетровск	STA9090	Украина	Рак легких	12
37	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
38	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
39	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
40	Барнаул	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10
41	Ярославль	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10
42	Екатеринбург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
43	Донецк	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	6
44	Черкассы	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	10
45	Днепропетровск	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	10
46	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
47	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
48	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
49	Санкт-Петербург	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
50	Тамбов	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
51	Запорожье	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	10
52	Нижний Новгород	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
53	Москва	LSO-OL006	Россия	Колоректальный рак	15
54	Киев	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	8
55	Харьков	LSO-OL006	Украина	Колоректальный рак	12
56	Тула	SM101-201	Россия	ИТП	4
57	Ижевск	SM101-201	Россия	ИТП	2
58	Санкт-Петербург	SM101-201	Россия	ИТП	4
59	Киев	SM101-201	Украина	ИТП	9
60	Днепропетровск	SM101-201	Украина	ИТП	5
61	Одесса	SM101-201	Украина	ИТП	2
62	Электросталь	SM101-201	Россия	ИТП	8
63	Екатеринбург	SM101-201	Россия	ИТП	9
64	Нижний Новгород	SM101-201	Россия	ИТП	6
65	Рязань	SM101-201	Россия	ИТП	4
66	Краснодар	SM101-201	Россия	ИТП	5
67	Сочи	SM101-201	Россия	ИТП	8
68	Харьков	SM101-201	Украина	ИТП	9
69	Саратов	SM101-201	Россия	ИТП	8
70	Москва	SM101-201	Россия	ИТП	15

Примечание: ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура.

Table 4

Prognosis of enrollment at the start of the study (estimated enrollment)

№	City	Study N	Country	Nosology	Proposed of enrollment
1	Moscow	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
2	Sochi	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
3	St. Petersburg	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
4	Kursk	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
5	Vitebsk	CS001P3	Belarus	Head and neck cancer	12
6	Minsk	CS001P3	Belarus	Head and neck cancer	12
7	Saint Petersburg	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
8	Omsk	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
9	Ekaterinburg	CS001P3	Russia	Head and neck cancer	5
10	Chelyabinsk	STA9090	Russia	Lungs' cancer	12
11	Penza	STA9090	Russia	Lungs' cancer	6
12	Tula	STA9090	Russia	Lungs' cancer	15
13	Saint Petersburg	STA9090	Russia	Lungs' cancer	12
14	Moscow	STA9090	Russia	Lungs' cancer	10
15	Sochi	STA9090	Russia	Lungs' cancer	10
16	Saint Petersburg	STA9090	Russia	Lungs' cancer	12
17	Vladivostok	STA9090	Russia	Lungs' cancer	5
18	Donetsk	STA9090	Russia	Lungs' cancer	14
19	Chernivtsi	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	15
20	Lutsk	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	15
21	Zaporozhye	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	12
22	Kyiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	13
23	Kyiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	12
24	Volgograd	STA9090	Russia	Lungs' cancer	18
25	Pyatigorsk	STA9090	Russia	Lungs' cancer	12
26	Samara	STA9090	Russia	Lungs' cancer	8
27	Nizhny Novgorod	STA9090	Russia	Lungs' cancer	24
28	Voronezh	STA9090	Russia	Lungs' cancer	14
29	Stavropol	STA9090	Russia	Lungs' cancer	10
30	Krivoy Rog	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	12
31	Sumy	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	25
32	Kyiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	15
33	Kazan	STA9090	Russia	Lungs' cancer	7
34	Kharkiv	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	14
35	Moscow	STA9090	Russia	Lungs' cancer	10
36	Dnepropetrovsk	STA9090	Ukraine	Lungs' cancer	12
37	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15

End of the table 4

№	City	Study N	Country	Nosology	Proposed of enrollment
38	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
39	Moscow	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
40	Barnaul	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	10
41	Yaroslavl	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	10
42	Ekaterinburg	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
43	Donetsk	LSO-OL006	Ukraine	colorectal cancer	6
44	Cherkasy	LSO-OL006	Ukraine	colorectal cancer	10
45	Dnepropetrovsk	LSO-OL006	Ukraine	colorectal cancer	10
46	Moscow	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
47	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
48	Moscow	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
49	Saint Petersburg	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
50	Tambov	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
51	Zaporozhye	LSO-OL006	Ukraine	colorectal cancer	10
52	Nizhny Novgorod	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
53	Moscow	LSO-OL006	Russia	colorectal cancer	15
54	Kyiv	LSO-OL006	Ukraine	colorectal cancer	8
55	Kharkiv	LSO-OL006	Ukraine	colorectal cancer	12
56	Tula	SM101-201	Russia	ITP	4
57	Izhevsk	SM101-201	Russia	ITP	2
58	Saint Petersburg	SM101-201	Russia	ITP	4
59	Kyiv	SM101-201	Ukraine	ITP	9
60	Dnepropetrovsk	SM101-201	Ukraine	ITP	5
61	Odessa	SM101-201	Ukraine	ITP	2
62	Elektrostal	SM101-201	Russia	ITP	8
63	Ekaterinburg	SM101-201	Russia	ITP	9
64	Nizhny Novgorod	SM101-201	Russia	ITP	6
65	Ryazan	SM101-201	Russia	ITP	4
66	Krasnodar	SM101-201	Russia	ITP	5
67	Sochi	SM101-201	Russia	ITP	8
68	Kharkiv	SM101-201	Ukraine	ITP	9
69	Saratov	SM101-201	Russia	ITP	8
70	Moscow	SM101-201	Russia	ITP	15

Note: ITP – idiopathic thrombocytopenic purpura

Соотношение финального набора пациентов, предполагаемого набора пациентов и заболеваемости представлено на рисунке 1.

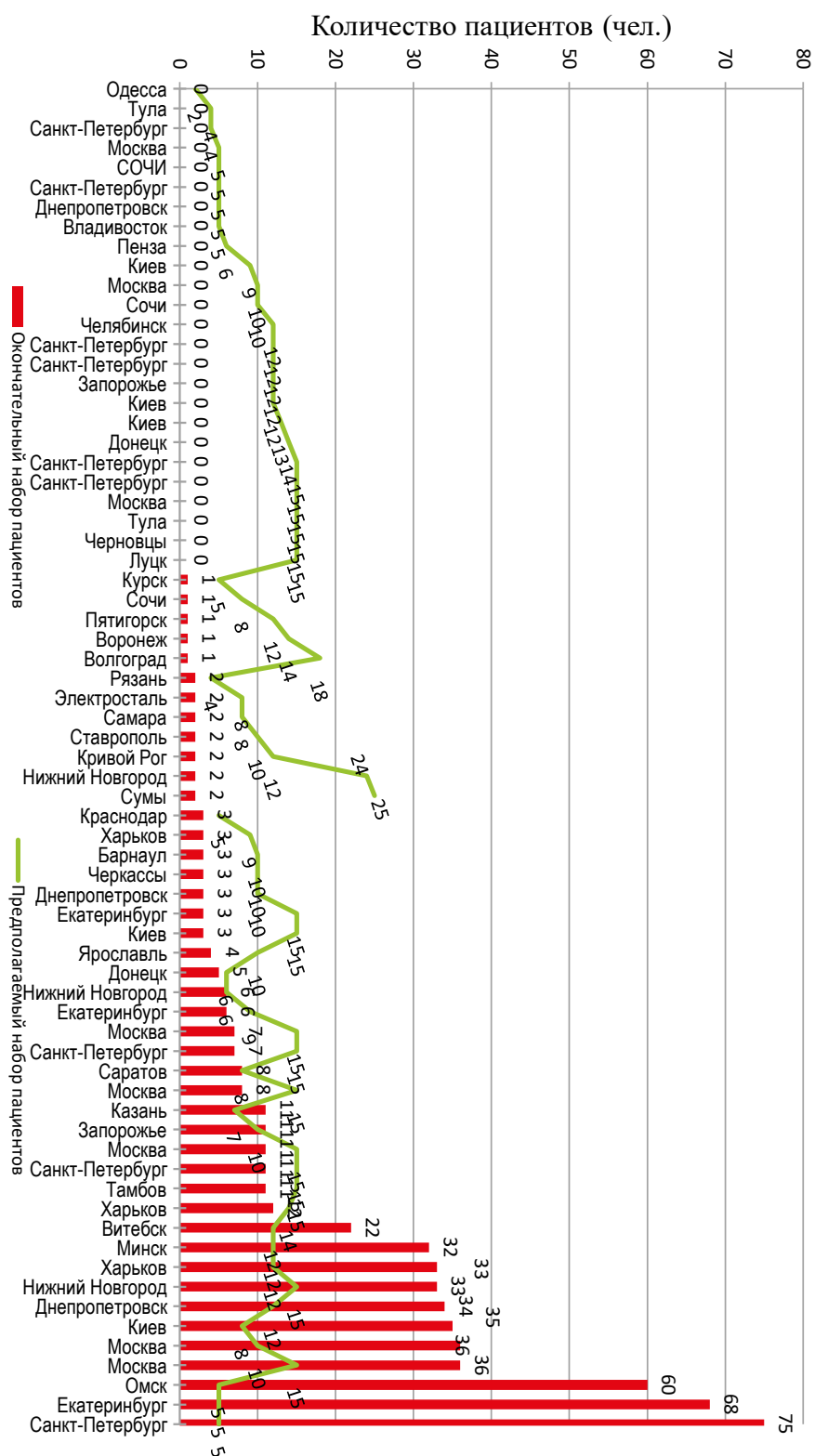


Рис.1. Соотношение предполагаемого набора пациентов и фактического выполненного набора.

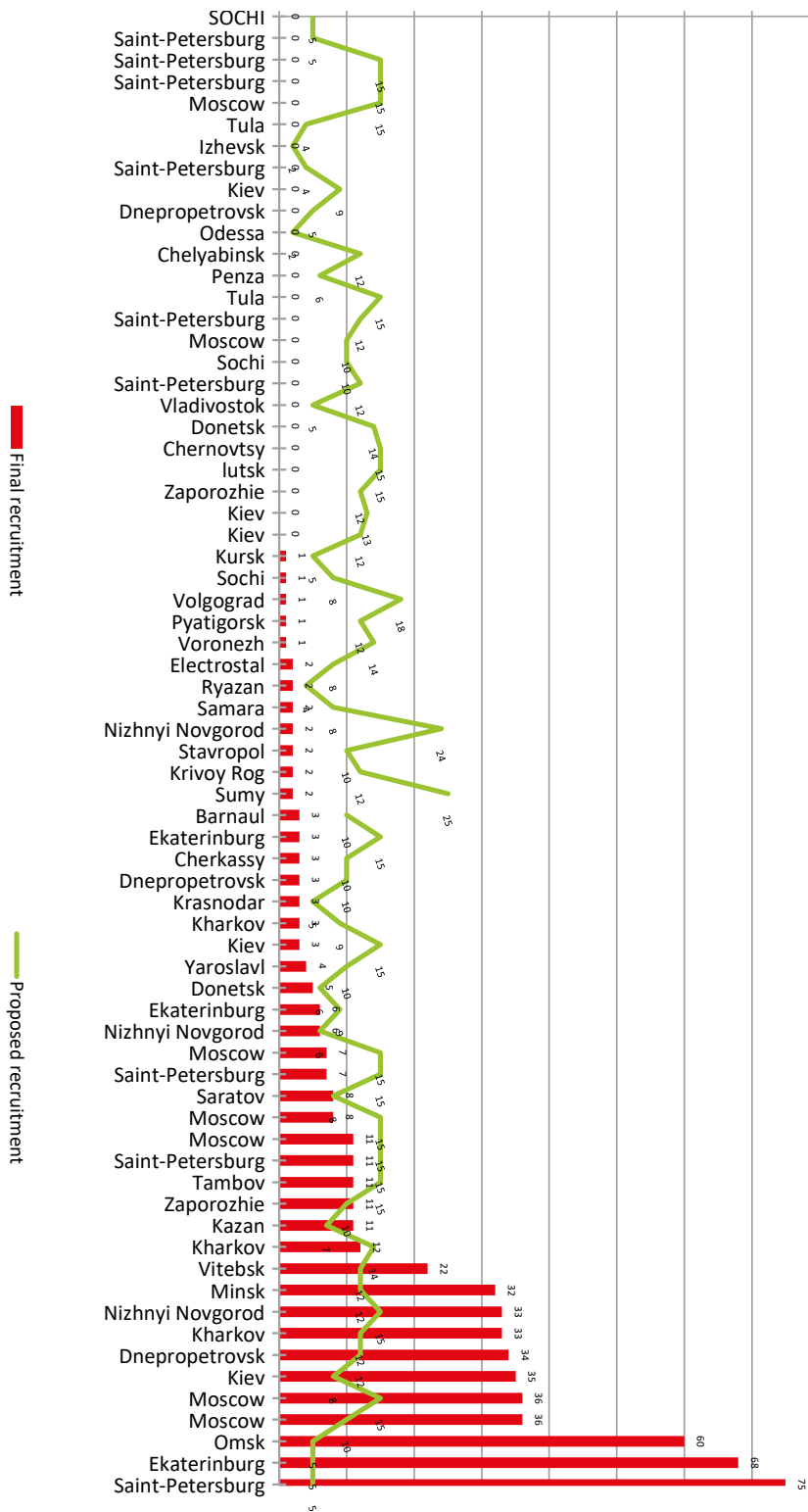


Fig. 1. Ratio between the estimated enrollment of patients and the actual completed enrollment

Параметры, поддающиеся статистической обработке представлены в таблице 5.

Таблица 5

Значения параметров со статистическими значениями

№	Параметры	Статистические показатели N = 70					
		Мин-макс	σ , доверительный интервал	$X \pm m$	CV, %	Медиана	Мода
1	Тип сайта по набору пациентов	1–4	0,1	2,1 ± 0,05	50,9	2	1
2	Время первичного ответа в днях	1–120	1,9	24,16 ± 0,97	90,3	15	7
3	Предполагаемый набор пациентов	2–25	0,4	10,6 ± 0,2	44,4	12	15
4	Финальный период набора пациентов в днях	728–1092	13,3	806,3 ± 6,65	18,6	728	728
5	Финальная скорость набора пациентов в месяц, pts per month	0–2,89	0,1	0,33 ± 0,03	187,1	0,077	0
6	Финальное количество набранных пациентов	0–75	1,4	8,89 ± 0,72	182,6	2	0
7	Опыт исследователя в годах	0–12	0,2	5,69 ± 0,09	36,6	6	6
8	Время первого скрининга в днях	0–480	9,5	76,33 ± 4,7	140,3	20	0

Table 5

Parameter values with statistical values

№	Parameters	Statistical values N = 70					
		Min-max	σ , confidence interval	$X \pm m$	CV, %	Mediana	Moda
1	Site type for recruitment of patients	1–4	0.1	2.1 ± 0.05	50.9	2	1
2	Initial response time in days	1–120	1.9	24.16 ± 0.97	90.3	15	7
3	Estimated patient enrollment	2–25	0.4	10.6 ± 0.2	44.4	12	15
4	Final recruitment period in days	728–1092	13.3	806.3 ± 6.65	18.6	728	728
5	Final patient recruitment rate per month, pts per month	0–2.89	0.1	0.33 ± 0.03	187.1	0.077	0
6	Final number of recruited patients	0–75	1.4	8.89 ± 0.72	182.6	2	0
7	Researcher experience in years	0–12	0.2	5.69 ± 0.09	36.6	6	6
8	Time of first screening in days	0–480	9.5	76.33 ± 4.7	140.3	20	0

Соотношения параметров представлены в таблице 6.

Таблица 6

Значения показателей со статистическими показателями

№	Показатели	Статистические показатели					
		Мин-макс	σ , доверительный интервал	$X \pm m$	CV, %	Медиана	Мода
1	Отношение времени первичного ответа в дн/предполагаемому набору пациентов	0,2–22,5	0,3	2,99 ± 0,17	128,6	2	0,58
2	Отношение времени первого скрининга в днях/время первичного ответа в днях	0–38,57	0,7	5,18 ± 0,33	145,6	2,1	0
3	Отношение предполагаемого набора пациентов/таргетный набор пациентов	0,51–21,74	0,3	4,32 ± 0,17	86,4	3,1	3,1

Table 6

№	Indicators	Statistical values N = 70					
		Min-макс	σ , confidence interval	$X \pm m$	CV, %	Mediana	Moda
1	Ratio of Primary Response Time in Days/Estimated Patient Enrollment	0.2–22.5	0.3	2.99 ± 0.17	128.6	2	0.58
2	Ratio of First Screening Time in days/Initial Response Time in days	0–38.57	0.7	5.18 ± 0.33	145.6	2.1	0
3	Intended Enrollment/Targeted Enrollment Ratio	0.51–21.74	0.3	4.32 ± 0.17	86.4	3.1	3.1

Далее был проведен корреляционный анализ с финальным набором пациентов с помощью пакет Excel 2016 (таблица 7).

Таблица 7

Корреляционные связи параметров и показателей, r

Название параметра	Набранное количество пациентов в клиническом центре	финальная скорость набора пациентов	Фактическая продолжительность набора пациентов в днях	Опыт исследователя в клинических исследованиях в годах
Тип сайта	0,81	0,81	0,21	–
Время первичного отклика в днях	-0,26	0,27	-0,03	–
Отношение предполагаемого набора пациентов /таргетному набору пациентов	0,5	–	0,51	-0,27
Отношение время первичного ответа в дн/предполагаемому набору пациентов	–	-0,23	0,45	–

Table 7

Correlations of parameters and indicators, r

Parameters	Number of patients recruited at the clinical site	Final recruitment rate	Actual duration of patient recruitment in days	Investigator experience in clinical trials in years
Site Type	0.81	0.81	0.21	-
Initial response time in days	-0.26	0.27	-0.03	-
Intended Enrollment/Targeted Enrollment Ratio	0.5	-	0.51	-0.27
Ratio of Primary Response Time in Days/Estimated Patient Enrollment	-	-0.23	0.45	-

Незначительное число параметров имеют статистическую корреляционную связь с финальным числом набранных пациентов, что требует дальнейшего изучения.

Протокол клинического исследования включает в себя прогноз набора пациентов в виде преуказанного, и обязанность следовать протоколу закреплена GCP, поэтому задержка в наборе па-

циентов или недостижение таргетного набора, также является отклонением от протокола [15, 17, 18]. Саватеев А.В. с соавторами, а также другие исследователи считают, что при проведении оценки физибиальности обязательным является изучение эпидемиологических параметров заболеваемости и распространенности болезней и GCP в разделе до исследования требует от сайта показать коли-

чество пациентов достаточную для достижения целевого набора и рассчитать скорость набора пациентов, что на практике ограничивается только предполагаемым набором пациентов и наши данные подтверждают это — в клинические исследования включались центры, которые при проведении оценки физибиальности заявляли набор пациентов больше нуля, хотя заболеваемость и распространенность болезни протокола не давала предпосылок к набору пациентов в локации от отобранного клинического центра [6, 16]. Аналогичные выводы по отбору клинических центров приводят L. Wynn, а также D. Gross, когда в клиническое исследование отбирались сайты на основании субъективного мнения специалистов клинических исследований [12, 19]. Для объективизации возможностей клинического центра по набору пациентов до старта рекрутингового периода авторы предлагают расчетные методы [20, 21], мы предлагаем расширить использование параметров и соотношения параметров — показателей с одного параметра — предполагаемый набор пациентов до включения в обязательную оценку сайтов расчетный параметр — тип сайта и время первичного отклика в днях.

Выводы

На основании многолетних наблюдений и последующего ретроспективного анализа четырёх международных мультицентровых клинических исследований, успешных по набору пациентов, были выявлены, изучены и впервые предложены объективные параметры и показатели, позволяющие спрогнозировать набор пациентов на этапе отбора клинических центров. В результате исследования сделаны выводы о необходимости расширения использования параметров и соотношения параметров: вместо показателей одного параметра — предполагаемый набор пациентов до включения в обязательную оценку сайтов расчетный параметр, необходимо дополнительно учитывать также следующие параметры: тип сайта и время первичного отклика в днях. Использование предложенных параметров

и показателей уменьшит вероятность неудачи в наборе пациентов.

References / Библиографический список

- Hill AB. The clinical trial. *British Medical Bull.* 1951;7(4):278–82. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a073919
- Byar DP, Simon RM, Friedewald WT, Schlesselman JJ, DeMets DL, Ellenberg JH, Gail MH, Ware JH. Randomized clinical trials. Perspectives on some recent ideas. *N Engl J Med.* 1976;295(2):74–80. doi: 10.1056/NEJM197607082950204
- Zelen M. The randomization and stratification of patients to clinical trials. *J Chronic Dis.* 1974;27:365–375.
- Friedman LM, Furberg CD, DeMets DL. *Fundamentals of Clinical Trials.* Springer New York, NY. 2010. 456 p. doi:10.1007/978-1-4419-1586-3
- Lievre M. Premature discontinuation of clinical trial for reasons not related to efficacy, safety, or feasibility Commentary: Early discontinuation violates Helsinki principles. *BMJ.* 2001;322(7286):603–606. doi:10.1136/bmj.322.7286.603
- Savateev AV, Belotserkovsky MV, Moscicka K., Palumbo D. Physical assessment as a cornerstone of a successful clinical trial. *Qualitative Clinical Practice.* 2013;2:37–46. [Саватеев А.В., Белоцерковский М.В., Мосцицка К., Палумбо Д. Оценка физибиальности как краеугольный камень успешного клинического исследования // Качественная клиническая практика № 2: 2013; С. 37–46] (In Russian).
- Parke J. Tips and tricks for successful participant recruitment a diversified, equitable & inclusive guide to patient recruitment. 2022, 20p. https://www.linkedin.com/feed/update/urn:li:activity:6972052976576147456?utm_source=share&utm_medium=member_desktop (Access date 02.07. 2023).
- Hunninghake DB. (Workshop Chairman): Workshop on recruitment experience in NHLBI-supported clinical trials. National Heart, Lung, and Blood Institute. Bethesda, MD. 1986. 486 p.
- Probstfield JL, Wittes JT, Hunninghake DB. Recruitment in NHLBI population-based studies and randomized clinical trials: data analysis and survey results. *Control Clin Trials.* 1987;8(4 Suppl):141S-149S. doi: 10.1016/0197-2456(87)90017-1
- Hunninghake DB, Darby CA, Probstfield JL. Recruitment experience in clinical trials: literature summary and annotated bibliography. *Control Clin Trials.* 1987;8(4 Suppl):6S-30S. doi: 10.1016/0197-2456(87)90004-3
- Guideline for good clinical practice E6(R2) EMA/CHMP/ICH/135. 1995. 68 p.
- Gross CP, Mallory R, Heiat A, Krumholz HM. Reporting the recruitment process in clinical trials: who are these patients and how did they get there? *Ann Intern Med.* 2002;137(1):10–6. doi: 10.732 / 0003-4819-137-1-200207020-00007
- Kaprin AD, Starinsky VV, Shakhzadova AO. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). 2021. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. 252 p. [Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена —

филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2021. 252 с.] (In Russian).

14. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, Ghanima W, Godeau B, González-López TJ, Grainger J, Hou M, Kruse C, McDonald V, Michel M, Newland AC, Pavord S, Rodeghiero F, Scully M, Tomiyama Y, Wong RS, Zaja F, Kuter DJ. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2019;3(22):3780–3817. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000812

15. Bestuzhev-Lada IV. Ahead of the 21st century: prospects, forecasts, futurology. Anthology of modern classical prognostics 1959–1999. 2000. Publisher: M.: Academia. Moscow. 480 pp. [Бестужев-Лада И.В. Впереди XXI век: перспективы, прогнозы, футурологии. Антология современной классической прогностики 1959–1999. 2000. Издательство: М.: Academia. Москва. 480 с.] (In Russian).

16. Kibby M. Patient recruitment feasibility. *Applied Clinical Trials.* 2011;20(6):80–87.

17. Pirozhkova S.V. Prediction, forecast, scenario: on the issue of the diversity of the results of the study of the future. *Philosophy of*

Science and Technology. 2016;21(2):111–129. [Пирожкова С.В. Предсказание, прогноз, сценарий: к вопросу о разнообразии результатов исследования будущего // Философия науки и техники. 2016. № 2. <https://cyberleninka.ru/article/n/predskazanie-prognoz-stsenariy-k-voprosu-o-raznoobrazii-rezultatov-issledovaniya-buduschego> (дата обращения: 03.08.2023)]. (In Russian).

18. Wager E, Tooley PJ, Emanuel MB, Wood SF. How to do it. Get patients' consent to enter clinical trials. *BMJ.* 1995;311(7007):734–7. doi: 10.1136/bmj.311.7007.734

19. Wynn L, Miller S, Faughnan L, Luo Z, Debenham E, Adix L, Fish B, Hustace T, Kelly T, Macdermott M, Marasciulo J, Martin B, McDuffie J, Murphy M, Rackoff B, Reed C, Seaman P, Thomas G, Wang W. Recruitment of infants with sickle cell anemia to a Phase III trial: data from the BABY HUG study. *Contemp Clin Trials.* 2010;31(6):558–63. doi: 10.1016/j.cct.2010.08.007

20. Woodin KE, Schneider JC. The CRA's Guide to Monitoring Clinical Research. Third Edition, CenterWatch. 2003. P. 447.

21. Segal JB, Powe NR. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006;4:2377–2383. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02147.x

Ответственный за переписку: Милованов Святослав Сергеевич, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1. Email: milovanovss@gmail.com
Милованов С.С. ORCID 0000–0001–9843–6096

Corresponding author: Milovanov Svyatoslav Sergeevich, Lomonosov Moscow State University 119991. Leninskiye gory, 1, Moscow, Russian Federation. Email: milovanovss@gmail.com
Milovanov S.S. ORCID 0000–0001–9843–6096











МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА MEDICAL GENETICS


DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-515-531
EDN: IHQKOH

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Нарушения метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона при невынашивании беременности

С.А. Васильев^{1,2}  , О.Ю. Васильева¹ , Б. Оппонг-Пепрах²,
В.В. Деменова¹ , А.С. Зуев¹ , Е.А. Саженова¹ ,
Т.В. Никитина¹ , Е.Н. Толмачева¹ 

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр, г. Томск, Российская Федерация

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация
 stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Аннотация. *Актуальность.* Нарушения эпигенетической регуляции генов, ответственных за развитие эмбриона и плаценты, ассоциированы со многими патологиями беременности. *Цель.* Целью настоящей работы стал анализ распространенности нарушений метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и с наиболее частыми анеуплоидиями (трисомия 16 и моносомия X). *Материалы и методы.* Оценка профиля метилирования была проведена с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в ворсинах хориона медицинских абортусов (n = 10), спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (n = 39), трисомией 16 (n = 17) и моносомией X (n = 20) и лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев (n = 6). *Результаты и обсуждение.* Было обнаружено дифференциальное метилирование отдельных CpG-сайтов в изученных генах в ворсинах хориона спонтанных абортусов. Несмотря на отсутствие значимых отличий между группами по среднему уровню метилирования в изученных регионах генов, отклонения уровня метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* были выявлены для 33 % и 5 % спонтанных абортусов, соответственно, что указывает на высокую частоту распространения эпигенетических аномалий по этим генам в ворсинах хориона спонтанных абортусов. Уровень метилирования гена *PRDM16*

© Васильев С.А., Васильева О.Ю., Оппонг-Пепрах Б., Деменова В.В., Зуев А.С., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Толмачева Е.Н., 2023



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

значимо коррелировал с уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1, что указывает на генерализованный характер нарушений метилирования у спонтанных абортусов. Наконец, уровень метилирования гена *PTPRN2* зависел от возраста матерей спонтанных абортусов с моносомией X, что поднимает вопрос о влиянии материнских факторов на профиль метилирования в этой группе спонтанных абортусов. **Выводы.** Полученные результаты указывают, что эпигенетические нарушения гена *PRDM16* могут быть связаны со спонтанным прерыванием беременности в первом триместре.

Ключевые слова: *PRDM16*, *PTPRN2*, метилирование ДНК, ворсины хориона, невынашивание беременности, анеуплоидия, бисульфитное секвенирование, спонтанные абортусы

Информация о финансировании. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23–15–00341.

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

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

Благодарности — неприменимо.









Этическое утверждение. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Информированное согласие на публикацию. Перед началом исследования все участники исследования дали добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Поступила 14.10.2023. Принята 14.11.2023.


Для цитирования: Васильев С.А., Васильева О.Ю., Оппонг-Пепрах Б., Деменева В.В., Зувев А.С., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Толмачева Е.Н. Нарушения метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона при невынашивании беременности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 4. С. 515–531. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–515–531

Abnormal methylation of *PRDM16* and *PTPRN2* genes in chorionic villi in miscarriage

Stanislav A. Vasilyev^{1,2}  , Oksana Yu. Vasilyeva¹ , Bismark Oppong-Peprah²,
Victoria V. Demeneva¹ , Andrey S. Zuev¹ , Elena A. Sazhenova¹ ,
Tatiana V. Nikitina¹ , Ekaterina N. Tolmacheva¹ 

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

 stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Abstract. Relevance. Abnormal epigenetic regulation of genes responsible for the development of the embryo and placenta is associated with many pregnancy pathologies. **Aim.** The aim of this work was to analyze the prevalence of abnormal methylation of the *PRDM16* and *PTPRN2* genes in chorionic villi of spontaneous abortions with normal karyotype and with

the most frequent aneuploidies (trisomy 16 and monosomy X). *Materials and Methods*. The methylation profile was evaluated using targeted bisulfite massive parallel sequencing in chorionic villi of induced abortions ($n = 10$), spontaneous abortions with normal karyotype ($n = 39$), trisomy 16 ($n = 17$) and monosomy X ($n = 20$) and peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers ($n = 6$). *Results and Discussion*. In analyzed genes, differential methylation of individual CpG sites was found in chorionic villi of spontaneous abortions. Despite the absence of significant differences between the groups in the average level of methylation in analyzed gene regions, abnormal methylation of the *PRDM16* and *PTPRN2* genes were detected for 33 % and 5 % of spontaneous abortions, respectively, indicating a high incidence of epigenetic abnormalities in these genes in the chorionic villi of spontaneous abortions. The level of methylation of the *PRDM16* gene significantly correlated with the level of methylation of the retrotransposon LINE-1, which indicates the generalized nature of methylation disorders in spontaneous abortions. Finally, the level of methylation of the *PTPRN2* gene depended on the age of mothers of spontaneous abortions with monosomy X, which raises the question of the influence of maternal factors on the methylation profile in this group of spontaneous abortions. *Conclusion*. The results indicate that epigenetic disorders of the *PRDM16* gene may be associated with spontaneous termination of pregnancy in the first trimester.

Keywords: PRDM16, PTPRN2, DNA methylation, chorionic villi, miscarriage, aneuploidy, bisulfite sequencing, spontaneous abortions

Funding. The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 23–15–00341.

Author contributions. All authors made a significant contribution to the development of the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

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

Acknowledgements— not applicable.

Ethics approval. The study was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk NIMC (09.11.2020/No. 7).

Consent for publication. Before starting the study, all study participants gave voluntary written informed consent to participate in the study and the processing of personal data in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Received 14.10.2023. Accepted 14.11.2023.

For citation: Vasilyev SA, Vasilyeva OYu, Oppong-Peprah B, Demeneva VV, Zuev AS, Sazhenova EA, Nikitina TV, Tolmacheva EN Abnormal methylation of PRDM16 and PTPRN2 genes in chorionic villi in miscarriage. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):515–531. doi: 10.22363/2313–0245–2023–27–4–515–531

Введение

Репродуктивные потери у человека являются крайне частым событием. Демографические исследования показали, что шансы произвести жизнеспособное потомство у женщины среднего репродуктивного возраста в пределах одного менструального цикла не превышают 25 % [1]. При этом около 15 % клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерывается в течение первого

триместра [2]. Ранняя эмбриональная гибель является наиболее тяжелым проявлением генетических нарушений, среди которых наибольшими по размеру являются нарушения числа хромосом — анеуплоидия. Действительно, от 50 до 60 % спонтанных абортусов первого триместра беременности имеют анеуплоидии по различным хромосомам [3–5].

Тяжесть фенотипа ранней эмбриональной гибели обуславливает возможность существования

в этом периоде и масштабных эпигенетических нарушений. Действительно, значительные нарушения метилома выявлены в плаценте при различных патологиях беременности на поздних сроках: преэклампсии, задержке роста плода, гестационном диабете [6]. Особый интерес представляют гены, нарушения метилирования которых обнаруживаются при различных патологиях беременности. Одними из них являются гены *PRDM16* и *PTPRN2*, имеющие большое число CpG-островков.

Кроме того, в наших предварительных исследованиях показаны масштабные нарушения метилома и в хорионе спонтанных абортусов первого триместра как с анеуплоидным, так и с нормальным кариотипом [7, 8]. Это может объяснять гибель большей части эмбрионов в период первого триместра, когда происходит ремоделирование спиральных артерий матки, благодаря которому обеспечивается дальнейший быстрый рост и развитие эмбриона. Однако, неясно, насколько распространены аномалии метилирования генов среди спонтанных абортусов I триместра. Поэтому целью исследования являлся анализ распространенности нарушений метилирования генов *PRDM16* и *PTPRN2* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и наиболее частыми анеуплоидиями (трисомия 16 и моносомия X).

Материалы и методы

В качестве исследуемого материала использовались ворсины хориона спонтанных абортусов с трисомией 16 ($n = 17$, гестационный возраст $8,6 \pm 1,4$ недели), с моносомией X ($n = 20$, гестационный возраст $10,5 \pm 1,7$ недели), с нормальным кариотипом ($n = 39$, гестационный возраст $9,9 \pm 2,3$ недели), а также медицинских абортусов ($n = 10$, гестационный возраст $8,3 \pm 1,2$ недели). Кроме того, был проведен анализ образцов лимфоцитов периферической крови 6 взрослых добровольцев. Образцы, взятые из биобанка «Биобанк населения Северной Азии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, были получены в период с 1993 по 2022 год. Для всех образцов из биобанка было получено инфор-

мированное согласие родителей на использование биоматериала для биобанкирования и проведения исследований. Также были получены информированные согласия от здоровых добровольцев.

Для определения кариотипа сразу после получения свежего материала до замораживания был проведен стандартный цитогенетический анализ на прямых препаратах ворсин хориона и в культурах фибробластов экстраэмбриональной мезодермы [9]. Результаты кариотипирования всех спонтанных абортусов с анеуплоидией были подтверждены методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Для анализа моносомии по X хромосоме были использованы центромеро-специфичные ДНК-зонды на хромосому X, а для анализа трисомии по 16 хромосоме были использованы субтеломерные ДНК-зонды (16q и 16p). Анализ проводился по описанной методике [10].

Образцы тканей хранились при температуре -80 °С. Разделение тканей проводилось морфологически стерильными инструментами, после чего клетки обрабатывались протеиназой К и инкубировались ночь при 37 °С. Выделение ДНК проводилось с помощью стандартного фенол-хлороформного метода. Концентрации ДНК измерялись с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (США). Бисульфитная модификация ДНК проводилась с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. В ходе бисульфитной конверсии неметилированный цитозин метилируется в 5'-положении и модифицируется в урацил, который при дальнейшей ПЦР считывается как тимин. Метилированный цитозин не подвергается какой-либо модификации.

Анализ профиля метилирования проводился с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Для получения библиотек были использованы разработанные олигонуклеотидные праймеры, позволяющие амплифицировать с бисульфит-конвертированной ДНК участки генов *PRDM16* и *PTPRN2* (табл. 1). Амплификация целевого фрагмента проводилась

с помощью набора БиоМастер HS-Тaq ПЦР (2×) (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. ПЦР проводилась в следующих условиях: 95 °С 5 мин; 40 циклов: 95 °С 30 с, 60 °С 45 с, 72 °С 45 с. Концентрацию целевых фрагментов

определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo, США). Продукты реакции очищали от примесей с помощью раствора сефадекса G50 (Sigma, США).

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения библиотек для таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования

Table 1

Sequences of oligonucleotide primers used to obtain libraries for targeted bisulfite massive parallel sequencing

Наименование / Name		Последовательность / Sequence	Продукт, п.н. / Product, bp	Координаты (hg38) / Coordinates (hg38)
PTPRN2_m2	F	5'-ATTGGTTATGTTTGGTAATTGTTA-3'	268	chr7:157542717-157542984
	R	5'-CCACAAAACCTTAAATACTACATCC-3'		
PTPRN2_m4	F	5'-TAAGATTTATATTGAGTAAATTAGGTTGTA-3'	310	chr7:158019641-158019950
	R	5'-AAATCTAAAATCCAAAAATATCTAAC-3'		
PRDM16_m1	F	5'-TGTTTTAGAGAGTTTGTGAGGTGTAT-3'	358	chr1:3117444-3117801
	R	5'-CTATAATCCCATAAAAACCAACAC-3'		
PRDM16_m3	F	5'-GAAGGTAGGGTGGGTTTTATTATT-3'	373	chr1:3237449-3237821
	R	5'-CAAAACCTTAAAAACCCAAAATCTA-3'		
PRDM16_m4	F	5'-GTTTAGTTTTGTTGGAGTTTATA-3'	350	chr1:3238668-3239017
	R	5'-ACATATAAAAAACCTATCCCAAACAC-3'		
PRDM16_m5	F	5'-GTGGTGTTTTAAATTGTTTAGG-3'	381	chr1:3241142-3241522
	R	5'-AACCAAAAAACCCCAATCATAC-3'		
PRDM16_m6	F	5'-AAGGAGTGGATGTAGAAGTTGTTAT-3'	598	chr1:3279081-3279678
	R	5'-TCCTACAACACAAACTCTCCCTAAC-3'		

Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование было проведено на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Micro Kit (2 × 150). Оценка качества прочтений была выполнена с помощью FastQC v0.11.8, после чего был проведен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore. Затем прочтения были картированы на бисульфит-конвертированные таргетные последовательности с помощью инструмента bwa-meth v0.2.2 с параметрами по умолчанию. Данные по метилированию в контексте CpG были извлечены из полученных файлов BAM с помощью инструмента MethylDackel. Результаты представлялись в виде уровня метилирования,

представляющего собой отношение числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тимининов в отдельном CpG-сайте. Кроме того, был вычислен средний уровень метилирования вдоль всей области интереса. Статистический анализ был выполнен с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Ранговый критерий Манна-Уитни был использован для сравнения уровня метилирования между группами образцов. Для определения границ выбросов в группе медицинских абортусов использовались формулы $Q_1 - 1,5 \times IQR$ и $Q_3 + 1,5 \times IQR$, где Q_1 и Q_3 — первый и третий квартиль, соответственно, IQR — межквартильное расстояние. Отличия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании был проведен анализ профиля метилирования генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом: наиболее частыми анеуплоидиями (трисомией 16, моносомией X) и нормальным кариотипом. В качестве контрольных групп сравнения использовались медицинские абортусы первого триместра беременности и лимфоциты периферической крови их родителей.

Ген *PTPRN2* находится в субтеломерном регионе длинного плеча хромосомы 7. Проанализированная область гена включает отдельные участки в 11–21 экзонах и соответствующих интронах (рис. 1). Было обнаружено значимое повышение уровня метилирования в группе спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению с группой медицинских абортусов по 8 из 24 проанализированных CpG-сайтов, а один CpG-сайт был гипометилирован ($p < 0,05$) (рис. 1). У спонтанных абортусов с моносомией X не было обнаружено значимых отличий по уровню метилирования, а у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был значимо снижен уровень метилирования только одного CpG-сайта (того же, что и у спонтанных абортусов с трисомией 16) ($p < 0,05$).

Ген *PRDM16* расположен в субтеломерной области короткого плеча хромосомы 1. Проанализированная область гена включает 2–3 экзона и 1–3 интроны (рис. 2). Было обнаружено значимое повышение уровня метилирования в группе спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению с группой медицинских абортусов по 11 из 94 проанализированных CpG-сайтов ($p < 0,05$) (рис. 2). У спонтанных абортусов с моносомией X было обнаружено 2 гиперметилированных CpG-сайта, а у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был значимо повышен уровень метилирования только одного CpG-сайта ($p < 0,05$).

Несмотря на отличия в уровне метилирования отдельных CpG-сайтов, средние уровни метилиро-

вания исследуемых генов вдоль всей проанализированной области значимо не отличались между группами абортусов. При этом были обнаружены значимые различия для уровней метилирования всех генов по сравнению с лимфоцитами периферической крови взрослых индивидов ($p < 0,05$), в которых уровень метилирования исследуемых генов составлял около 90 % (рис. 3). Это может указывать на транскрипционную активность данных генов в клетках ворсин хориона в отличие от лимфоцитов периферической крови взрослого организма.

Группы спонтанных абортусов с различным кариотипом характеризовались значительно большей вариацией уровня метилирования исследованных генов по сравнению с медицинскими абортусами. Это соответствует результатам наших предыдущих работ, где у спонтанных абортусов было обнаружено как снижение [11], так и повышение [8] уровня метилирования ретротранспозона LINE-1. Наблюдаемые широкие границы вариации уровня метилирования различных генов в группах спонтанных абортусов могут объясняться масштабной разбалансировкой метилома в ворсинах хориона. Учитывая, что при этом в большинстве случаев не наблюдается значимых отличий по уровню метилирования проанализированных генов у спонтанных абортусов по сравнению с группой медицинских абортусов, такая разбалансировка происходит только у части спонтанных абортусов.

Поэтому был проведен анализ нарушений уровня метилирования у отдельных спонтанных абортусов относительно группы медицинских абортусов. Для этого были вычислены пороговые значения вариации уровня метилирования для каждого гена в группе медицинских абортусов. Все значения в группах спонтанных абортусов, выходящие за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, рассматривались как гипо- и гиперметилированные (табл. 2).

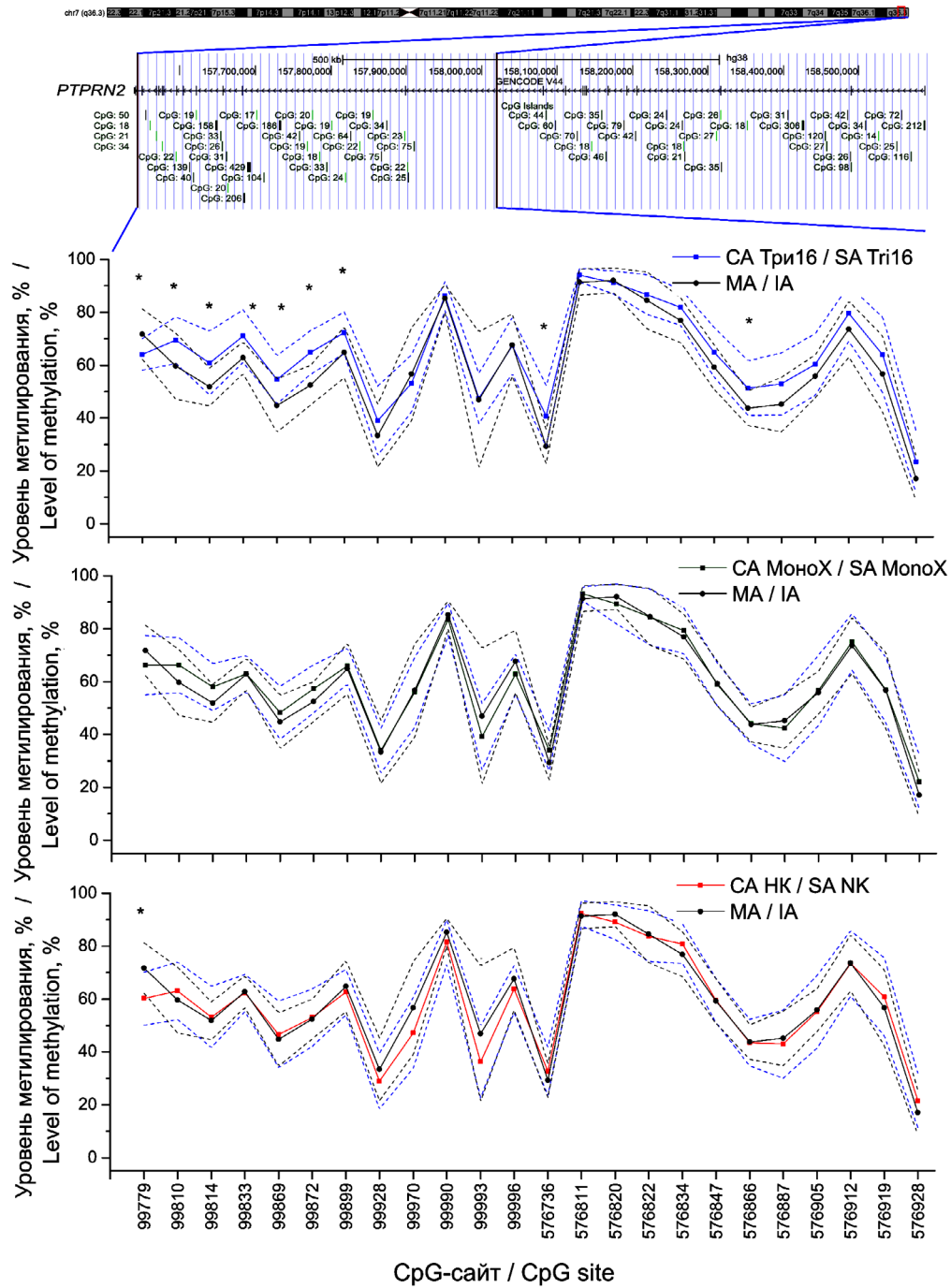


Рис. 1. Профиль метилирования CpG-сайтов в анализируемом регионе (обозначен красными вертикальными полосами на схеме) гена *PTPRN2* в группах спонтанных абортусов с трисомией 16 (СА Три16), с моносомией X (СА МоноX) и с нормальным кариотипом (СА НК) по сравнению с группой медицинских абортусов (МА). Пунктирными линиями показано стандартное отклонение профиля метилирования; * – $p < 0,05$

Fig. 1. The methylation profile of CpG sites in the analyzed region (indicated by red vertical stripes in the diagram) of the *PTPRN2* gene in the groups of spontaneous abortions with trisomy 16 (SA Tri16), with monosomy X (SA MonoX) and with normal karyotype (SA NK) compared with the group of induced abortions (IA). Dotted lines show standard deviation of the methylation profile; * – $p < 0,05$

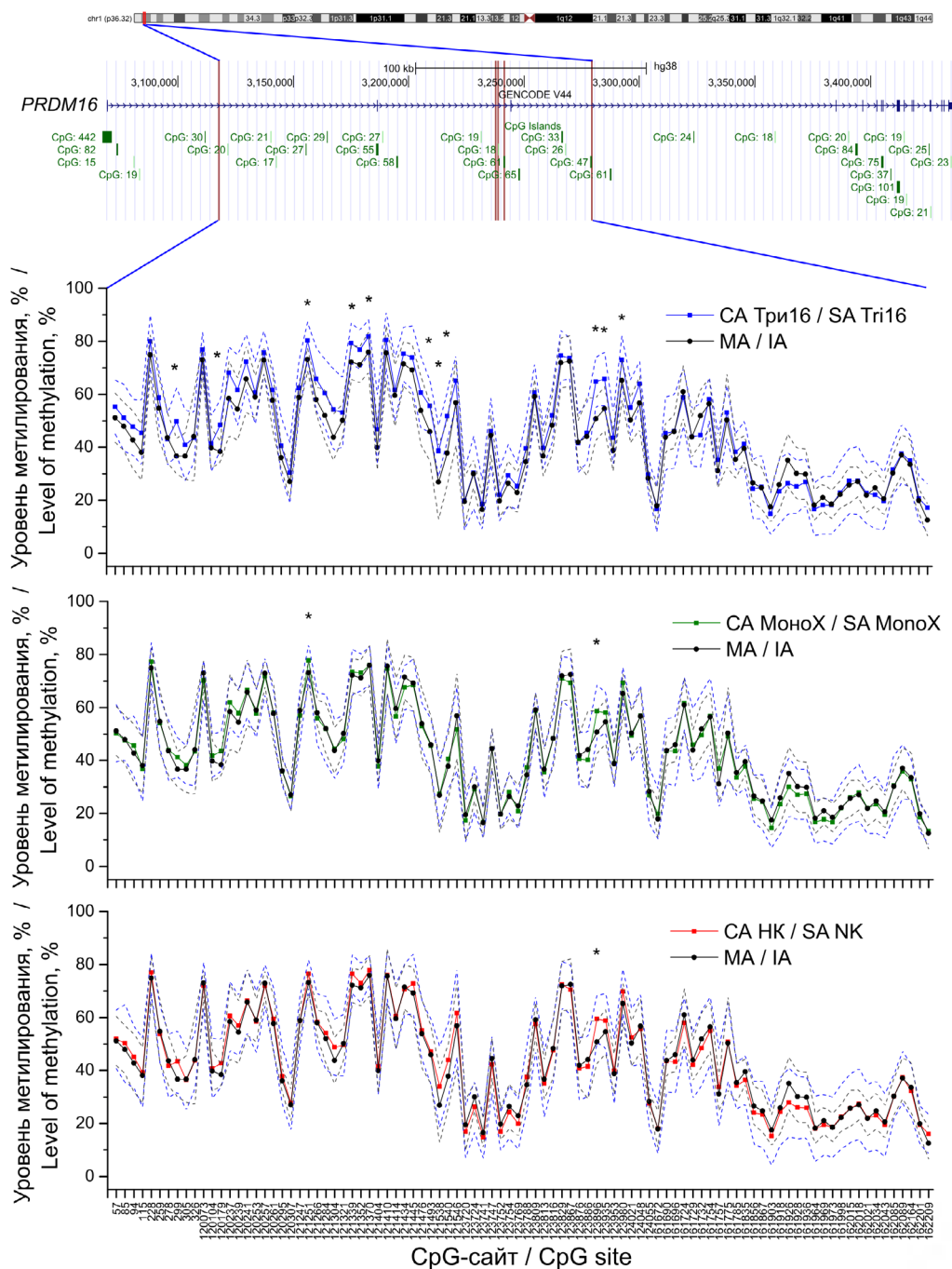


Рис. 2. Профиль метилирования CpG-сайтов в анализируемом регионе (обозначен красными вертикальными полосами на схеме) гена *PRDM16* в спонтанных абортусов с трисомией 16 (Три 16), с моносомией X (Моно X) и с нормальным кариотипом (CA НК) по сравнению с группой медицинских абортусов (МА).

Пунктирными линиями показано стандартное отклонение профиля метилирования; * – $p < 0,05$

Fig. 2. The methylation profile of CpG sites in the analyzed region (indicated by red vertical stripes in the diagram) of the *PRDM16* gene in the groups of spontaneous abortions with trisomy 16 (SA Tri16), with monosomy X (SA MonoX) and with normal karyotype (SA NK) compared with the group of induced abortions (IA).

Dotted lines show standard deviation of the methylation profile; * – $p < 0.05$

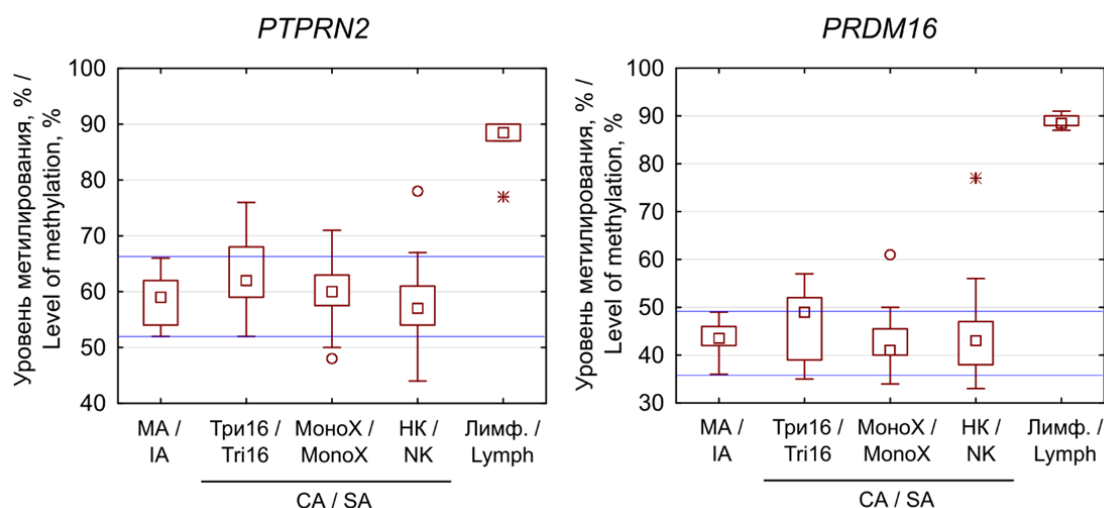


Рис. 3. Средний уровень метилирования проанализированных CpG-сайтов генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона в группах спонтанных абортусов с трисомией 16, с моносомией X, с нормальным кариотипом по сравнению с медицинскими абортусами и лимфоцитами периферической крови взрослых индивидов. Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией 16, Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X, НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, Лимф. – лимфоциты взрослых индивидов, МА – медицинские абортусы. Квадрат в центре прямоугольника обозначает медиану. Боксы обозначают 25-й и 75-й процентиля. Усы отмечают границы выбросов, голубыми линиями отмечены границы выбросов в группе МА

Fig. 3. The average level of methylation of the analyzed CpG sites of the *PTPRN2* and *PRDM16* genes in chorionic villi in groups of spontaneous abortions with trisomy 16, with monosomy X, with normal karyotype compared with induced abortions and peripheral blood lymphocytes of adult individuals. Tri16 – spontaneous abortions with trisomy 16, MonoX – spontaneous abortions with monosomy X, NK – spontaneous abortions with normal karyotype, Lymph – lymphocytes of adult individuals, IA – induced abortions. The square in the center of the box represents the median. The boxes represent the 25th and 75th percentiles. Whiskers mark the outlier thresholds; blue lines mark the outlier thresholds in the IA group

Таблица 2

Число образцов с гипер- или гипометилированием исследуемых генов, выходящим за пределы вариации в группе медицинских абортусов

Table 2

The number of samples with hyper- or hypomethylation of the studied genes beyond the limits of variation in the group of induced abortions

Гены/степень метилирования Genes/methylation degree		Порог в группе МА (%) / Threshold in IA group	СА Три16 / SA Tri16	СА Моно X / SA Mono X	СА НК / SA NK	Всего
PTPRN2	Гипо- / Hypo-	44,5	0/17	0/20	1/39	5 % (4/76)
	Гипер- / Hyper-	72,5	2/17	0/20	1/39	
PRDM16	Гипо- / Hypo-	37,375	3/17	3/20	7/39	33 % (25/76)
	Гипер- / Hyper-	50,375	7/17	1/20	4/39	

Примечание: представлено количество и доля абортусов с уровнем метилирования выше, чем верхняя граница (гипер-), и ниже, чем нижняя граница (гипо-), диапазона вариации в группе медицинских абортусов. МА – медицинские абортусы, СА НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, СА Моно X – спонтанные абортусы с моносомией по X-хромосоме, СА Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией по 16 хромосоме.

Note: the number and proportion of abortions with a methylation level higher than the upper threshold (hyper-) and lower than the lower threshold (hypo-) of the range of variation in the group of induced abortions are presented. IA – induced abortions, SA Tri 16 – spontaneous abortions with trisomy on the 16 chromosome, SA Mono X – spontaneous abortions with monosomy on the X chromosome, SA NK – spontaneous abortions with normal karyotype.

Было обнаружено, что 33 % всех спонтанных абортусов имело нарушения уровня метилирования по гену *PRDM16* и 5 % спонтанных абортусов имело нарушения уровня метилирования по гену *PTPRN2*. При этом нарушения метилирования гена *PRDM16* наблюдались не только в группе спонтанных абортусов с трисомией 16, для которых характерно гиперметилированное состояние генома в клетках ворсин хориона [7], но и в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (28 %).

Параллельно с анализом профиля метилирования исследуемых генов, для тех же образцов ворсин хориона спонтанных и медицинских абортусов был проведен анализ профиля метилирования ретротранспозона LINE-1 также с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Ретротранспозон LINE-1 занимает около 21 % генома человека и поэтому уровень метилирования его промотора часто рассматривается в качестве маркера глобального метилирования всего генома человека. Ранее в работах нашей группы было показано, что спонтанные абортусы с анеуплоидией по различным хромосомам характеризуются повышенным уровнем метилирования LINE-1, а среди

спонтанных абортусов с нормальным кариотипом часть спонтанных абортусов имеет повышенный, а часть — сниженный уровень метилирования LINE-1 [8]. Поэтому, в настоящем исследовании был проведен корреляционный анализ между уровнем метилирования LINE-1 и средним уровнем метилирования исследуемых генов в группах спонтанных абортусов с различным кариотипом.

Было обнаружено, что в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом с уровнем метилирования LINE-1 значимо коррелирует уровень метилирования гена *PRDM16* ($R = 0,36$, $p = 0,03$) (рис. 4). Для других групп спонтанных абортусов значимых корреляций выявлено не было. Таким образом, у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом со сниженным и повышенным уровнем метилирования гена *PRDM16* нарушения метилирования затрагивают не только этот ген, а носят более глобальный характер в масштабах генома. Такие нарушения уровня метилирования могут быть связаны с недостаточным или избыточным функционированием базовых механизмов метилирования ДНК, независимых или слабо зависимых от локального геномного контекста.

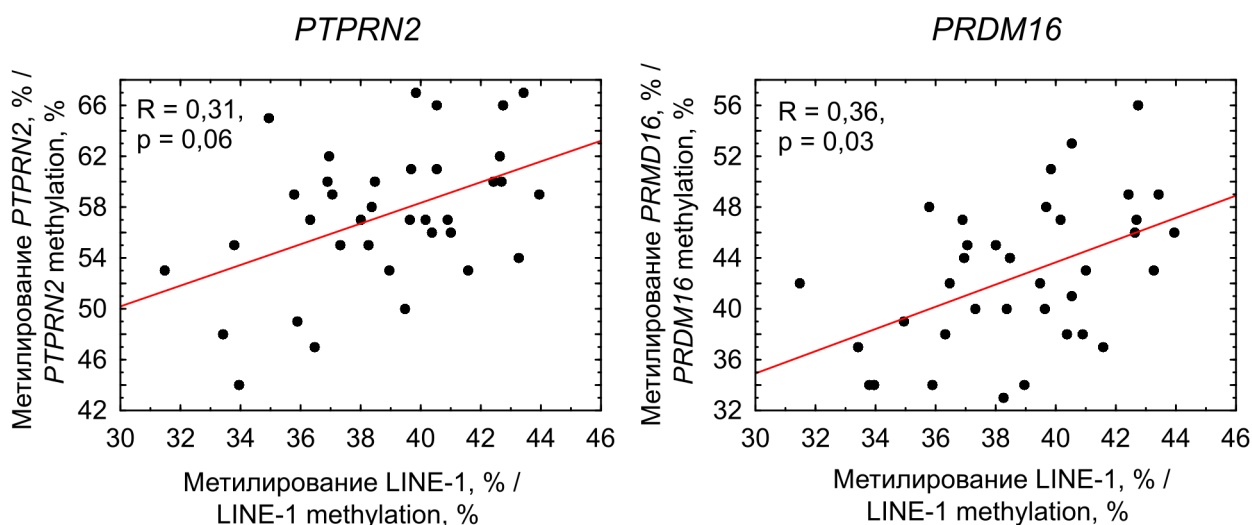


Рис. 4. Зависимость среднего уровня метилирования проанализированных CpG-сайтов генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом от среднего уровня метилирования ретротранспозона LINE-1

Fig. 4. Dependence of the average methylation level of the analyzed CpG sites of the *PTPRN2* and *PRDM16* genes in chorionic villi in the group of spontaneous abortions with normal karyotype on the average methylation level of the retrotransposon LINE-1

Уровень метилирования гена *PTPRN2* значимо снижался с повышением возраста матери в группе спонтанных абортусов с моносомией хромосомы X ($R = -0,53$, $p = 0,016$) (рис. 5). В других группах

спонтанных абортусов значимых корреляций с возрастом матери не наблюдалось. С возрастом отца также значимых корреляций обнаружено не было ни в одной из групп.

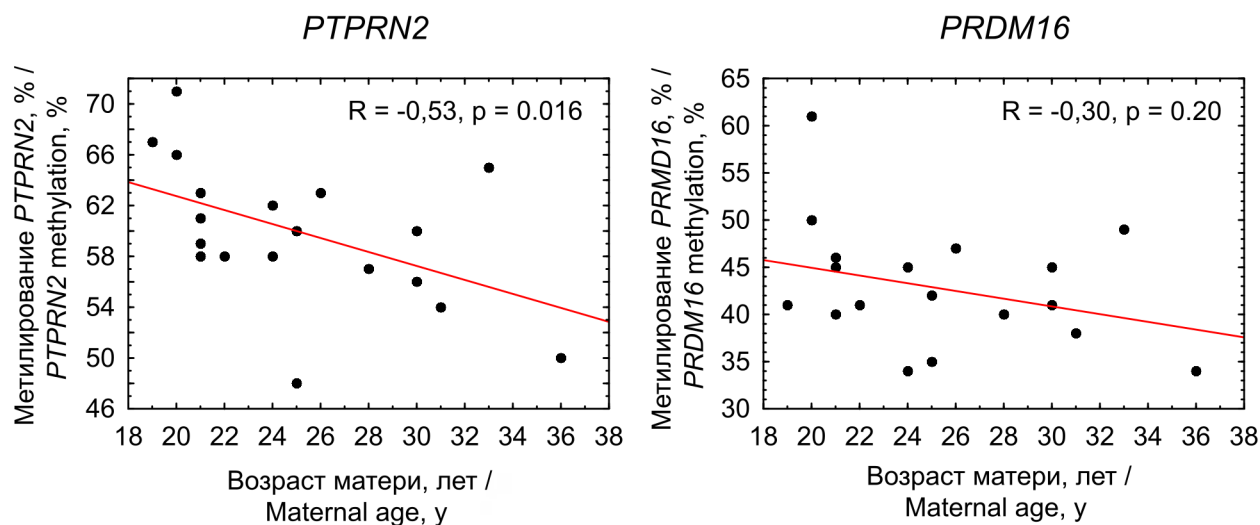


Рис. 5. Зависимость среднего уровня метилирования проанализированных CpG-сайтов генов *PTPRN2* и *PRDM16* в ворсинах хориона в группе спонтанных абортусов с моносомией X от возраста матери

Fig. 5. Dependence of the average methylation level of the analyzed CpG sites of the *PTPRN2* and *PRDM16* genes in chorionic villi in the group of spontaneous abortions with monosomy X on the maternal age

Ген *PRDM16* занимает очень протяженный участок в геноме (369,419 п. н.) и содержит в своем составе 33 CpG-островка. *PRDM16* является членом семейства белков, содержащих домен PR, и связан с различными заболеваниями, включая миелодиспластический синдром и Т-клеточный лейкоз взрослых [12, 13], а также аномалиями развития, такими как волчья пасть [14]. Известно также, что он действует как регулятор клеточной дифференцировки [15]. В развивающемся эмбрионе мыши экспрессия *PRDM16* обнаруживается на E9.5 в ограниченном числе тканей, а к E14.5 *PRDM16* экспрессируется в широком спектре развивающихся тканей, включая ткани головного мозга, легких, почек и желудочно-кишечного тракта [16].

Дифференциальное метилирование *PRDM16* при беременности связано с различными метаболическими нарушениями у матерей. В нескольких исследованиях показана связь с материнским диа-

бетом дифференциального метилирования *PRDM16* в крови детей [17–19], в ткани пуповины [20] и плаценты [21]. Известно, что *PRDM16* играет важную роль в развитии поджелудочной железы [22].

Кроме того, ген *PRDM16* вместе с геном *PTPRN2* был гиперметилирован в крови новорожденных от матерей с ожирением [23]. *PRDM16* имеет решающее значение для дифференцировки бурой жировой ткани [15], которая играет важную роль в удержании тепла и расходовании энергии на первом году жизни [24] и остается метаболически активной во взрослом возрасте. Дифференциальное метилирование *PRDM16* наблюдалось перед желудочным шунтированием и потерей веса в жировой ткани, что позволяет предположить, что уровень метилирования модифицируется потерей веса [25]. Было также обнаружено, что метилирование ДНК в *PRDM16* обратимо при неонатальном введении ресвератрола мышам-самцам [26]. Наличие диф-

ференциального метилирования в крови, а также в первичных тканях в этих исследованиях подчеркивает потенциал *PRDM16* в качестве биомаркера для скрининга, а также его потенциал в качестве ключевого участника метаболических регуляторных механизмов, на которые влияет материнское ожирение.

PRDM16 вместе с *PTPRN2* участвует в развитии нервной ткани [16, 27]. Дифференциальное метилирование генов *PRDM16* и *PTPRN2* в числе прочих было обнаружено в крови пациентов с расстройствами аутистического спектра [28]. В исследовании показано, что метилом мозга пациентов с аутизмом имеет сходство с метиломом эмбрионального мозга. Авторы высказывают гипотезу об эпигенетической задержке в метилировании ДНК в ходе развития мозга при расстройствах аутистического спектра, что может привести к нарушениям на уровне транскриптома [28]. Потеря *PRDM16* у *Danio rerio* и мыши приводит к нарушению эмбрионального развития и черепно-лицевым дефектам [29]. Это подтверждается и ассоциацией гена *PRDM16* с аномалиями развития, такими как волчья пасть [14].

Ген *PRDM16* является импринтированным с экспрессией с отцовского аллеля [30]. Дифференциальное метилирование гена *PRDM16* было обнаружено в образцах децидуального эпителия матки, полученного путем выскабливания, у женщин с привычным невынашиванием беременности [31]. Все это указывает на возможное влияние уровня метилирования гена *PRDM16* у матери на нормальное развитие потомства. Недавно оказалось, что ген *PRDM16* активно и специфично экспрессируется в ооцитах мышей и его экспрессия повышается при старении [32]. Это соответствует некоторому снижению уровня метилирования *PRDM16* с возрастом матери в нашем исследовании, хотя корреляция с возрастом матери и была незначимой. Ранее было показано гиперметилирование гена *PRDM16* в ооцитах мышей, полученных после культивирования фолликулов *in vitro* [33]. При двойном ооцит-специфичном нокауте генов *PRDM3* и *PRDM16* не наблюдалось пренатальной гибели, однако большинство мышей умирали в первые 2 месяца жизни [32].

Было высказано предположение, что аберрантное метилирование *PRDM16* вызывает мужское бесплодие [34], и его гипометилирование было обнаружено в образцах сперматозоидов с низкой подвижностью [35]. Кроме того, было обнаружено, что *PRDM16* дифференциально метилирован в сперматозоидах взрослых, подвергшихся жестокому обращению в детстве [36], и гиперметилирован в сперматозоидах потребителей каннабиса [37]. Наконец, на средний уровень метилирования *PRDM16* влияет протокол получения и отбора сперматозоидов. Дополнительный этап очистки от апоптотических сперматозоидов с помощью магнитной сепарации приводит к повышению уровня метилирования *PRDM16* в полученных сперматозоидах [38].

Таким образом, уровень метилирования гена *PRDM16* в гонадах вариабелен и может изменяться под влиянием различных факторов внутренней и внешней среды, включая уровень глюкозы в крови, ожирение и стресс. Дифференциальное метилирование *PRDM16* потенциально может наследоваться трансгенерационно и влиять на процессы в организме потомков. В составе *PRDM16* имеется домен SET, отвечающий за метилирование гистонов. Действительно, показано, что *PRDM16* регулирует хроматин благодаря контролю H3K9me3 и H3K4me3 в эмбриогенезе *Danio rerio* [29]. За счет влияния на регуляцию метилирования гистонов наблюдаемое в настоящей работе дифференциальное метилирование *PRDM16* может быть связано с множественными аномалиями транскриптома в ходе индивидуального развития и приводить к гибели эмбриона.

Ген *PTPRN2* занимает еще более протяженный участок в геноме (1,048,768 п.н.) и содержит в своем составе 63 CpG-островка. Интересно, что, как и в случае с геном *PRDM16*, регион гена *PTPRN2* (7q36.3) часто подвергается перестройкам при лейкемии [39].

Ген *PTPRN2* кодирует белок, который функционирует как основной островковый аутоантиген при диабете I типа [40–42]. Как и в случае с *PRDM16*, дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* часто обнаруживается при различных метаболических нарушениях, связанных с повышенной массой

тела [43]. Нарушение метилирования гена *PTPRN2* в островках Лангерганса поджелудочной железы было связано с повышенным риском развития диабета II типа [44]. Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* наблюдалось в плаценте и пуповинной крови при диабете беременных [21, 45–47] и коррелировало с уровнем глюкозы в плазме натощак у монозиготных близнецов [48]. Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* было обнаружено у индивидов, рожденных в период Великого китайского года в 1959–1961 годах [49]. При этом дифференциальное метилирование этого гена также было связано и с детским ожирением [47, 50]. Кроме того, вместе с геном *PRDM16*, ген *PTPRN2* был дифференциально метилирован в крови новорожденных от матерей с ожирением [23]. В недавнем исследовании уровень метилирования гена *PTPRN2* в подкожной жировой клетчатке также ассоциирован с уровнем триглицеридов в крови [51]. Наконец, дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* ассоциировано со стеатозом и неалкогольной жировой болезнью печени [52].

Эти результаты являются убедительным доказательством того, что локусы в *PTPRN2* плода, вероятно, поддаются модификации в зависимости от питания матери и факторов, влиявших на нее в течение беременности. Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* в назальном эпителии детей было связано с насилием и стрессом, пережитым их матерями [53]. Кроме того, ген *PTPRN2* был дифференциально метилирован в пуповинной крови новорожденных с задержкой роста плода [54, 55]. По-видимому, материнское влияние на уровень метилирования гена *PTPRN2* может быть связано и с трансгенерационным эпигенетическим наследованием уровня метилирования в гене *PTPRN2* от матерей к потомству [56]. Однако важен не только уровень метилирования гена *PTPRN2* у матери. Недавно была обнаружена связь дифференциального метилирования гена *PTPRN2* с мужским бесплодием [57].

Дифференциальное метилирование гена *PTPRN2* часто обнаруживается и при других заболеваниях, в том числе ишемической болезни сердца [58, 59] и синдроме Марфана [60]. Метилирование

и экспрессия *PTPRN2* были связаны с болезнью Паркинсона [61–64]. У однояйцевых близнецов дифференциальное метилирование *PTPRN2* было связано с депрессией [65]. Уровень метилирования *PTPRN2* в крови был связан с изменением уровня глюкозы и настроением у участников эксперимента по долговременной изоляции в рамках миссии Марс-500 [66]. Мета-анализ данных по всему эпигеному показал, что дифференциально метилированный участок в *PTPRN2* был связан с детской астмой [67], а гипометилированный *PTPRN2* был связан с быстрым снижением функции легких при астме и хроническом обструктивном бронхите [68]. Дифференциальное метилирование генов *PTPRN2* и *PRDM16* среди прочих в висцеральной жировой ткани позволяло выделить группу пациентов с раком прямой кишки [69].

Выводы

Таким образом, гены *PRDM16* и *PTPRN2*, дифференциально-метилированные у части спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами и связанные с уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1, обладают рядом сходных признаков. Это очень протяженные гены с большим числом CpG-островков в составе, что открывает широкие возможности для регуляции их активности с помощью метилирования ДНК. Дифференциальное метилирование в данных генах встречается при широком спектре заболеваний, в первую очередь связанных с нарушением метаболизма. Кроме того, дифференциальное метилирование этих генов наблюдается у плода в зависимости от метаболических проблем у матери. Наконец, нарушения метилирования обоих генов связаны с мужским бесплодием. Для обоих генов показана трансгенерационная эпигенетическая наследуемость. Однако в нашем исследовании среди спонтанных абортусов первого триместра нарушения по уровню метилирования наблюдались только для гена *PRDM16*, который при этом коррелировал с уровнем метилирования LINE-1. Полученные результаты указывают, что эпигенетические нарушения гена *PRDM16*, помимо

нарушений на более поздних сроках беременности, могут быть связаны со спонтанным прерыванием беременности в первом триместре.

Библиографический список/ References

- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril*. 1982;38(4): 447–53.
- Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*. 2009;2(2):76–83.
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet*. 1990;47(4):656–63.
- Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med*. 2005;7(4): 251–63. doi: 00125817-200504000-00005
- Baranov VS, Kuznetsova TV. Cytogenetics of human embryonic development. 2007. Saint-Petersburg, Russia. 639 p. [Баранов ВС, Кузнецова ТВ, Цитогенетика эмбрионального развития человека. 2007. СПб Изд-во Н-Л. 639 с.]. (In Russian).
- Vlahos A, Mansell T, Saffery R, Novakovic B. Human placental methylome in the interplay of adverse placental health, environmental exposure, and pregnancy outcome. *PLoS Genet*. 2019;15(8): e1008236. doi: 10.1371/journal.pgen.1008236
- Tolmacheva EN, Vasilyev SA, Nikitina TV, Lytkina ES, Sazhenova EA, Zhigalina DI, Vasilyeva OY, Markov AV, Demeneva VV, Tashireva LA, Kashevarova AA, Lebedev IN. Identification of differentially methylated genes in first-trimester placentas with trisomy 16. *Sci Rep*. 2022;12(1):1166. doi: 10.1038/s41598-021-04107-9
- Vasilyev SA, Tolmacheva EN, Vasilyeva OY, Markov AV, Zhigalina DI, Zatul LA, Lee VA, Serdyukova ES, Sazhenova EA, Nikitina TV, Kashevarova AA, Lebedev IN. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(1):139–149. doi: 10.1007/s10815-020-02003-1
- Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(7):513–20. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201178
- Vasilyev SA, Timoshevsky VA, Lebedev IN. Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239. *Russian Journal of Genetics*. 2010;46(11):1381–1385. doi: 10.1134/s1022795410110141
- Vasilyev SA, Tolmacheva EN, Kashevarova AA, Sazhenova EA, Lebedev IN. Methylation status of LINE-1 retrotransposon in chromosomal mosaicism during the early stages of human embryonic development. *Molecular Biology (Moscow)*. 2015;49(1):144–152. doi: 10.1134/S0026893314060193 [Васильев С.А., Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 1. С. 165–174. doi: 10.7868/S0026893314060196 V]. (In Russian).
- Nishikata I, Sasaki H, Iga M, Tateno Y, Imayoshi S, Asou N, Nakamura T, Morishita K. A novel EVI1 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36; q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. *Blood*. 2003;102(9):3323–32. doi: 10.1182/blood-2002-12-3944
- Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, Tanaka H, Taniwaki M, Yokota J, Morishita K. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36; q21)-positive leukemia cells. *Blood*. 2000;96(9):3209–14.
- Bjork B, Vieira A, Faust S, Camper S, Murray J, Beier D. Phenotypic, genetic, and developmental characterization of CPO1, a recessive ENU-induced mouse model of cleft palate. *Mouse Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Press, Woodbury, NY. 2006. 149 p.
- Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, Chin S, Tempst P, Lazar MA, Spiegelman BM. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*. 2008;22(10):1397–409. doi: 10.1101/gad.1666108
- Horn KH, Warner DR, Pisano M, Greene RM. PRDM16 expression in the developing mouse embryo. *Acta Histochem*. 2011;113(2):150–5. doi: 10.1016/j.acthis.2009.09.006
- Chen P, Piaggi P, Traurig M, Bogardus C, Knowler WC, Baier LJ, Hanson RL. Differential methylation of genes in individuals exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia*. 2017; 60(4): 645–655. doi: 10.1007/s00125-016-4203-1
- Taschereau A, Thibeault K, Allard C, Juvinao-Quintero D, Perron P, Lutz SM, Bouchard L, Hivert MF. Maternal glycemia in pregnancy is longitudinally associated with blood DNAm variation at the FSD1L gene from birth to 5 years of age. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1):107. doi: 10.1186/s13148-023-01524-7
- Cote S, Gagne-Ouellet V, Guay SP, Allard C, Houde AA, Perron P, Baillargeon JP, Gaudet D, Guerin R, Brisson D, Hivert MF, Bouchard L. PPARGC1alpha gene DNA methylation variations in human placenta mediate the link between maternal hyperglycemia and leptin levels in newborns. *Clin Epigenetics*. 2016;8:72. doi: 10.1186/s13148-016-0239-9
- Lim IY, Lin X, Teh AL, Wu Y, Chen L, He M, Chan SY, MacIsaac JL, Chan JKY, Tan KH, Chong MFF, Kobor MS, Godfrey KM, Meaney MJ, Lee YS, Eriksson JG, Gluckman PD, Chong YS, Karnani N. Dichotomy in the Impact of Elevated Maternal Glucose Levels on Neonatal Epigenome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107(3): e1277-e1292. doi: 10.1210/clinem/dgab710
- Wang WJ, Huang R, Zheng T, Du Q, Yang MN, Xu YJ, Liu X, Tao MY, He H, Fang F, Li F, Fan JG, Zhang J, Briollais L, Ouyang F, Luo ZC. Genome-Wide Placental Gene Methylations in Gestational Diabetes Mellitus, Fetal Growth and Metabolic Health Biomarkers in Cord Blood. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:875180. doi: 10.3389/fendo.2022.875180
- Sugiyama T, Benitez CM, Ghodasara A, Liu L, McLean GW, Lee J, Blauwkamp TA, Nusse R, Wright CV, Gu G, Kim SK. Reconstituting pancreas development from purified progenitor cells reveals genes essential for islet differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(31):12691–6. doi: 10.1073/pnas.1304507110

23. Sasaki A, Murphy KE, Briollais L, McGowan PO, Matthews SG. DNA methylation profiles in the blood of newborn term infants born to mothers with obesity. *PLoS One*. 2022;17(5): e0267946. doi: 10.1371/journal.pone.0267946
24. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(1):96–105. doi: 10.1172/JCI144271
25. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, Griffiths L, Hoffman EP, Stubbs RS, Macartney-Coxson D. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol*. 2015;16(1):8. doi: 10.1186/s13059-014-0569-x
26. Serrano A, Asnani-Kishnani M, Couturier C, Astier J, Palou A, Landrier JF, Ribot J, Bonet ML. DNA Methylation Changes are Associated with the Programming of White Adipose Tissue Browning Features by Resveratrol and Nicotinamide Riboside Neonatal Supplementations in Mice. *Nutrients*. 2020; 12(2). doi: 10.3390/nu12020461
27. Willi-Monnerat S, Migliavacca E, Surdez D, Delorenzi M, Luthi-Carter R, Terskikh AV. Comprehensive spatiotemporal transcriptomic analyses of the ganglionic eminences demonstrate the uniqueness of its caudal subdivision. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(4):845–56. doi: 10.1016/j.mcn.2008.01.009
28. Corley MJ, Vargas-Maya N, Pang APS, Lum-Jones A, Li D, Khadka V, Sultana R, Blanchard DC, Maunakea AK. Epigenetic Delay in the Neurodevelopmental Trajectory of DNA Methylation States in Autism Spectrum Disorders. *Front Genet*. 2019;10:907. doi: 10.3389/fgene.2019.00907
29. Shull LC, Sen R, Menzel J, Goyama S, Kurokawa M, Artinger KB. The conserved and divergent roles of Prdm3 and Prdm16 in zebrafish and mouse craniofacial development. *Dev Biol*. 2020;461(2):132–144. doi: 10.1016/j.ydbio.2020.02.006
30. Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, Bosko JM, Jirtle RL, Hartemink AJ. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res*. 2007;17(12):1723–30. doi: 10.1101/gr.6584707
31. Pi L, Zhang Z, Gu Y, Wang X, Wang J, Xu J, Liu J, Zhang X, Du J. DNA methylation profiling in recurrent miscarriage. *Peer J*. 2020;8: e8196. doi: 10.7717/peerj.8196
32. Nishimura H, Ikawa Y, Kajikawa E, Shimizu-Mizuno N, Hiver S, Tabata-Okamoto N, Mori M, Kitajima T, Hayashi T, Yoshimura M, Umeda M, Nikaido I, Kurokawa M, Watanabe T, Hamada H. Maternal epigenetic factors in embryonic and postnatal development. *Genes Cells*. 2023;28(6):422–432. doi: 10.1111/gtc.13024
33. Saenz-de-Juano MD, Ivanova E, Billooye K, Herta AC, Smits J, Kelsey G, Anckaert E. Genome-wide assessment of DNA methylation in mouse oocytes reveals effects associated with in vitro growth, superovulation, and sexual maturity. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):197. doi: 10.1186/s13148-019-0794-y
34. Qin L, Luo X-Q, Wei J-X, Wei Y-X, Wang J-L, Zhang L-L, Huang H-B, Wei X-C. Genome-wide DNA methylation analysis of oligospermia and asthenozoospermia in a Chinese population. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(4):3168–3184.
35. Pacheco SE, Houseman EA, Christensen BC, Marsit CJ, Kelsey KT, Sigman M, Boekelheide K. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One*. 2011;6(6): e20280. doi: 10.1371/journal.pone.0020280
36. Roberts AL, Gladish N, Gatev E, Jones MJ, Chen Y, MacIsaac JL, Tworoger SS, Austin SB, Tanrikut C, Chavarro JE, Baccarelli AA, Kober MS. Exposure to childhood abuse is associated with human sperm DNA methylation. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):194. doi: 10.1038/s41398-018-0252-1
37. Murphy SK, Itchon-Ramos N, Visco Z, Huang Z, Grenier C, Schrott R, Acharya K, Boudreau MH, Price TM, Raburn DJ, Corcoran DL, Lucas JE, Mitchell JT, McClernon FJ, Cauley M, Hall BJ, Levin ED, Kollins SH. Cannabinoid exposure and altered DNA methylation in rat and human sperm. *Epigenetics*. 2018;13(12):1208–1221. doi: 10.1080/15592294.2018.1554521
38. Stimpfel M, Vrtacnik-Bokal E. Minor DNA methylation changes are observed in spermatozoa prepared using different protocols. *Andrology*. 2020; 8(5): 1312–1323. doi: 10.1111/andr.12832
39. Gulino GM, Bruno F, Sturiale V, Brancato D, Ragusa D, Tosi S, Saccone S, Federico C. From FISH to Hi-C: The Chromatin Architecture of the Chromosomal Region 7q36.3, Frequently Rearranged in Leukemic Cells, Is Evolutionary Conserved. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5). doi: 10.3390/ijms22052338
40. Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL. IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6367–70. doi: 10.1073/pnas.93.13.6367
41. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2307–11. doi: 10.1073/pnas.93.6.2307
42. Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem*. 1996;271(30):18161–70. doi: 10.1074/jbc.271.30.18161
43. Dragic D, Ennour-Idrissi K, Michaud A, Chang SL, Durocher F, Diorio C. Association Between BMI and DNA Methylation in Blood or Normal Adult Breast Tissue: A Systematic Review. *Anticancer Res*. 2020;40(4):1797–1808. doi: 10.21873/anticancer.14134
44. Ouni M, Saussenthaler S, Eichelmann F, Jahnert M, Stadion M, Wittenbecher C, Ronn T, Zellner L, Gottmann P, Ling C, Schulze MB, Schurmann A. Epigenetic Changes in Islets of Langerhans Preceding the Onset of Diabetes. *Diabetes*. 2020;69(11):2503–2517. doi: 10.2337/db20-0204
45. Weng X, Liu F, Zhang H, Kan M, Wang T, Dong M, Liu Y. Genome-wide DNA methylation profiling in infants born to gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;142:10–18. doi: 10.1016/j.diabres.2018.03.016
46. Awamleh Z, Butcher DT, Hanley A, Retnakaran R, Haertle L, Haaf T, Hamilton J, Weksberg R. Exposure to Gestational Diabetes Mellitus (GDM) alters DNA methylation in placenta and fetal cord blood. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021; 174: 108690. doi: 10.1016/j.diabres.2021.108690
47. Yang IV, Zhang W, Davidson EJ, Fingerlin TE, Kechris K, Dabelea D. Epigenetic marks of in utero exposure to gestational diabetes and childhood adiposity outcomes: the EPOCH study. *Diabet Med*. 2018;35(5):612–620. doi: 10.1111/dme.13604

48. Wang W, Yao W, Tan Q, Li S, Duan H, Tian X, Xu C, Zhang D. Identification of key DNA methylation changes on fasting plasma glucose: a genome-wide DNA methylation analysis in Chinese monozygotic twins. *Diabetol Metab Syndr*. 2023;15(1):159. doi: 10.1186/s13098-023-01136-4
49. Li S, Wang W, Zhang D, Li W, Lund J, Kruse T, Mengel-From J, Christensen K, Tan Q. Differential regulation of the DNA methylome in adults born during the Great Chinese Famine in 1959–1961. *Genomics*. 2021;113(6):3907–3918. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.09.018
50. Lee S. The association of genetically controlled CpG methylation (cg158269415) of protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (PTPRN2) with childhood obesity. *Sci Rep*. 2019;9(1):4855. doi: 10.1038/s41598-019-40486-w
51. Ronn T, Perfilyev A, Jonsson J, Eriksson KF, Jorgensen SW, Brons C, Gillberg L, Vaag A, Stener-Victorin E, Ling C. Circulating triglycerides are associated with human adipose tissue DNA methylation of genes linked to metabolic disease. *Hum Mol Genet*. 2023;32(11):1875–1887. doi: 10.1093/hmg/ddad024
52. Melton PE, Burton MA, Lillycrop KA, Godfrey KM, Rauschert S, Anderson D, Burdge GC, Mori TA, Beilin LJ, Ayonrinde OT, Craig JM, Olynyk JK, Holbrook JD, Pennell CE, Oddy WH, Moses EK, Adams LA, Huang RC. Differential DNA methylation of steatosis and non-alcoholic fatty liver disease in adolescence. *Hepatol Int*. 2023;17(3):584–594. doi: 10.1007/s12072-022-10469-7
53. Yan Q, Forno E, Cardenas A, Qi C, Han YY, Acosta-Perez E, Kim S, Zhang R, Boutaoui N, Canino G, Vonk JM, Xu CJ, Chen W, Marsland A, Oken E, Gold DR, Koppelman GH, Celedon JC. Exposure to violence, chronic stress, nasal DNA methylation, and atopic asthma in children. *Pediatr Pulmonol*. 2021;56(7):1896–1905. doi: 10.1002/ppul.25372
54. Krishna RG, Vishnu Bhat B, Bobby Z, Papa D, Badhe B, Kalidoss VK, Karli S. Identification of differentially methylated candidate genes and their biological significance in IUGR neonates by methylation EPIC array. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022; 35(3): 525–533. doi: 10.1080/14767058.2020.1727881
55. Williams L, Seki Y, Delahaye F, Cheng A, Fuloria M, Hughes Einstein F, Charron MJ. DNA hypermethylation of CD3(+) T cells from cord blood of infants exposed to intrauterine growth restriction. *Diabetologia*. 2016;59(8):1714–23. doi: 10.1007/s00125-016-3983-7
56. Garcia E, Wiemels J, Marconett C, Corona K, Howe C, Foley H, Lerner D, Lurvey N, Farzan S, Bastain T, Breton C, Mohazzab-Hosseini S. Effect of Parental Adverse Childhood Experiences on Intergenerational DNA Methylation Signatures. *Res Sq*. 2023. doi: 10.21203/rs.3.rs-2977515/v1
57. Sarkar S, Sujit KM, Singh V, Pandey R, Trivedi S, Singh K, Gupta G, Rajender S. Array-based DNA methylation profiling reveals peripheral blood differential methylation in male infertility. *Fertil Steril*. 2019;112(1):61–72 e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.020
58. Agha G, Mendelson MM, Ward-Caviness CK, Joehanes R, Huan T, Gondalia R, Salfati E, Brody JA, Fiorito G, Bressler J, Chen BH, Lighthart S, Guarera S, Colicino E, Just AC, Wahl S, Gieger C, Vandiver AR, Tanaka T, Hernandez DG, Pilling LC, Singleton AB, Sacerdote C, Krogh V, Panico S, Tumino R, Li Y, Zhang G, Stewart JD, Floyd JS, Wiggins KL, Rotter JI, Multhaup M, Bakulski K, Horvath S, Tsao PS, Absher DM, Vokonas P, Hirschhorn J, Fallin MD, Liu C, Bandinelli S, Boerwinkle E, Dehghan A, Schwartz JD, Psaty BM, Feinberg AP, Hou L, Ferrucci L, Sotoodehnia N, Matullo G, Peters A, Fornage M, Assimes TL, Whitsel EA, Levy D, Baccarelli AA. Blood Leukocyte DNA Methylation Predicts Risk of Future Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2019;140(8):645–657. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039357
59. Krolevets M, Cate VT, Prochaska JH, Schulz A, Rapp S, Tenzer S, Andrade-Navarro MA, Horvath S, Niehrs C, Wild PS. DNA methylation and cardiovascular disease in humans: a systematic review and database of known CpG methylation sites. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1):56. doi: 10.1186/s13148-023-01468-y
60. van Andel MM, Groenink M, van den Berg MP, Timmermans J, Scholte A, Mulder BJM, Zwinderman AH, de Waard V. Genome-wide methylation patterns in Marfan syndrome. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):217. doi: 10.1186/s13148-021-01204-4
61. Chuang YH, Lu AT, Paul KC, Folle AD, Bronstein JM, Bordelon Y, Horvath S, Ritz B. Longitudinal Epigenome-Wide Methylation Study of Cognitive Decline and Motor Progression in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2019;9(2):389–400. doi: 10.3233/JPD-181549
62. Grunblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G, Li J, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Youdim MB. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004;111(12):1543–73. doi: 10.1007/s00702-004-0212-1
63. Sandor C, Robertson P, Lang C, Heger A, Booth H, Vowles J, Witty L, Bowden R, Hu M, Cowley SA, Wade-Martins R, Webber C. Transcriptomic profiling of purified patient-derived dopamine neurons identifies convergent perturbations and therapeutics for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(3):552–566. doi: 10.1093/hmg/ddw412
64. Kochmanski J, Kuhn NC, Bernstein AI. Parkinson's disease-associated, sex-specific changes in DNA methylation at PARK7 (DJ-1), SLC17A6 (VGLUT2), PTPRN2 (IA-2beta), and NR4A2 (NURR1) in cortical neurons. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022;8(1):120. doi: 10.1038/s41531-022-00355-2
65. Wang W, Li W, Wu Y, Tian X, Duan H, Li S, Tan Q, Zhang D. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses in monozygotic twins identify potential biomarkers of depression. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1):416. doi: 10.1038/s41398-021-01536-y
66. Liang F, Lv K, Wang Y, Yuan Y, Lu L, Feng Q, Jing X, Wang H, Liu C, Rayner S, Ling S, Chen H, Wan Y, Zhou W, He L, Wu B, Qu L, Chen S, Xiong J, Li Y. Personalized Epigenome Remodeling Under Biochemical and Psychological Changes During Long-Term Isolation Environment. *Front Physiol*. 2019;10:932. doi: 10.3389/fphys.2019.00932
67. den Dekker HT, Burrows K, Felix JF, Salas LA, Nedeljkovic I, Yao J, Rifas-Shiman SL, Ruiz-Arenas C, Amin N, Bustamante M, DeMeo DL, Henderson AJ, Howe CG, Hivert MF, Ikram MA, de Jongste JC, Lahousse L, Mandaviya PR, van Meurs JB, Pinart M, Sharp GC, Stolk L, Uitterlinden AG, Anto JM, Litonjua AA, Breton CV, Brusselle GG, Sunyer J, Smith GD, Relton CL, Jaddoe VWV, Duijts L. Newborn DNA-methylation, childhood lung function, and the risks of asthma and COPD across the life course. *Eur Respir J*. 2019;53(4). doi: 10.1183/13993003.01795-2018
68. Chen YC, Tsai YH, Wang CC, Liu SF, Chen TW, Fang WF, Lee CP, Hsu PY, Chao TY, Wu CC, Wei YF, Chang HC, Tsen CC,

Chang YP, Lin MC. Epigenome-wide association study on asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap reveals aberrant DNA methylations related to clinical phenotypes. *Sci Rep*. 2021;11(1):5022. doi: 10.1038/s41598-021-83185-1

69. Izquierdo AG, Boughanem H, Diaz-Lagares A, Arranz-Salas I, Esteller M, Tinahones FJ, Casanueva FF, Macias-Gonzalez M,

Crujeiras AB. DNA methylome in visceral adipose tissue can discriminate patients with and without colorectal cancer. *Epigenetics*. 2022;17(6):665–676. doi: 10.1080/15592294.2021.1950991

Ответственный за переписку: Васильев Станислав Анатольевич — доктор биологических наук, руководитель лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра, профессор кафедры генетики и клеточной биологии Национального исследовательского Томского государственного университета, Российская Федерация, 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки д. 10. E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Васильев С.А. SPIN 8087–5222; ORCID 0000–0002–5301–070X

Васильева О.Ю. SPIN 3582–1273; ORCID 0000–0001–5797–0014

Деменова В.В. SPIN 3631–0953; ORCID 0000–0002–5315–4914

Зуев А.С. SPIN 3235–1754; ORCID 0000–0001–9474–9335

Саженова Е.А. SPIN 8788–4112; ORCID 0000–0003–3875–3932

Никитина Т.В. SPIN 8941–1605; ORCID 0000–0002–4230–6855

Толмачева Е.Н. SPIN 7837–4073; ORCID 0000–0001–6427–3276

Corresponding author: Stanislav A. Vasilyev, PhD, Dr.Sc., Head of Laboratory of Genomic Tools, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Professor of Department of Genetics and Cell Biology of National Research Tomsk State University, 634050, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, Russian Federation. E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Vasilyev S.A. ORCID 0000–0002–5301–070X

Vasilyeva O. Yu. ORCID 0000–0001–5797–0014

Demeneva V.V. ORCID 0000–0002–5315–4914

Zuev A.S. ORCID 0000–0001–9474–9335

Sazhenova E.A. ORCID 0000–0003–3875–3932

Nikitina T.V. ORCID 0000–0002–4230–6855

Tolmacheva E.N. ORCID 0000–0001–6427–3276

