



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

**2024 Том 28 № 3**

**Тема номера: ФИЗИОЛОГИЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ**

**DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3**

**<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

### Зместители главного редактора

**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, г. Москва, Россия

**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

**АҚДИС 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, г. Шреверпорт, 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, г. 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 Габибович**, 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, г. Лондон, Великобритания

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

**НАПАРСТЕК Яков**, профессор, Университет Хадасса, г. Иерусалим, Израиль

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

**ПОЛЕВЩИКОВ 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. Уппсала, г. Уппсала, 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

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

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



## **RUDN JOURNAL OF MEDICINE**

**2024 Volume 28 No. 3**

**Theme of the issue: PHYSIOLOGY. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY**

**DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3**

**<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 named after Patrice Lumumba (RUDN University), Moscow, Russia

### Deputy Editors - in - Chief

**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

**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, RUDN University, 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, RUDN University, 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, RUDN University, 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

**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, Head of Research Laboratory, Department of Urology, University of Leipzig, 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, RUDN University, 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](mailto:medj@rudn.ru)

---

Литературный редактор *К.В. Зенкин*  
Компьютерная верстка: *М.В. Рогова*

Почтовый адрес редакции  
117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 10  
e-mail: [medj@rudn.ru](mailto:medj@rudn.ru)

Адрес издательства:  
115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3  
Тел.: (495) 955-07-16; e-mail: [publishing@rudn.ru](mailto:publishing@rudn.ru)

Подписано в печать 15.09.2024. Выход в свет 25.09.2024. Формат 60×84/8  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура «Tinos, Roboto».  
Усл. печ. л. 9,62. Тираж 500 экз. Заказ № 1055. 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; e-mail: [publishing@rudn.ru](mailto: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](mailto:medj@rudn.ru)

---

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

**Postal Address of the Editorial Board:**  
10 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russian Federation  
e-mail: [medj@rudn.ru](mailto:medj@rudn.ru)

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

Printing run 500 copies. Open price.

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

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

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

- Koryakin S., Petrushin K., Parshenkov M., Uruskhanova Z., Shchitkova A., Pechnikova E., Demyashkin G.**  
Kidney morphofunctional features after ascorbic acid administration in a model of acute radiation nephropathy (Морфофункциональные особенности почки после введения аскорбиновой кислоты в модели острой лучевой нефропатии) .....301
- Demyashkin G., Murtazaliev Z., Pugacheva E., Vadyukhin M., Vimurzaeva M., Milovanova A., Dengina T.**  
Proliferation and apoptosis features of ovarian follicles after local irradiation with electrons and platelet-rich plasma administration (Особенности пролиферации и апоптоза овариальных фолликулов после локального облучения электронами и введения плазмы, обогащенной тромбоцитами) .....311
- Судьина А.К., Иванов М.Э., Юрин А.М., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И.**  
Влияние глиальных клеток-предшественников на восстановление сенсомоторного дефицита у крыс после травмы головного мозга .....319
- Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Воронкова О.В., Чернышов Н.А., Гусакова С.В.**  
Роль эндогенного H<sub>2</sub>S при экспериментальном метаболическом синдроме .....331
- Ющук В.Н., Чепурнова Н.С., Маркелова Е.В., Ермолицкая М.З., Савченко А.Ю., Захаров И.Н., Андрющенко К.А., Барабаш П.В., Цзя Син Ян, Мещерякова Д.А., Плехова Н.Г.**  
Система протеолиз/антипротеолиз у условно здоровых мужчин и женщин разного возраста.....340

**ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ**

- Михайлова Ю.В., Стерликов С.А., Пономарёв С.Б., Аверьянова Е.Л.**  
Эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2023 году .....353

**ИММУНОЛОГИЯ**

- Guryanova S.V.**  
Influence of muramyl peptides on the production of chemokines, growth factors, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (Влияние мурамилпептидов на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов) .....365

**ДЕРМАТОЛОГИЯ**

- Pavlovic M., Rokvic Z., Ilic T.**  
Topical timolol maleate in the treatment of mixed and deep infantile hemangiomas: a report of two cases (Местное применение тимолола малеата в лечении смешанных и глубоких младенческих гемангиом: сообщение о двух случаях) .....377
- Kasikhina E.I., Nada A.Y., Ostretsova M.N., Zhukova O.V., Kochetkov M.A., Khanferyan R.A.**  
Monomorphic type clinical features of maculo-papular cutaneous mastocytosis (Особенности клинического течения мономорфного типа пятнисто-папулезного кожного мастоцитоза).....382

**АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ**

- Лисицына О.И., Макарова Н.П., Красный А.М., Екимов А.Н., Романов А.Ю., Долгушина Н.В.**  
Уровень копийности митохондриальной ДНК в культуральной среде эмбрионов человека как фактор прогноза наступления и пролонгирования беременности.....390

## CONTENTS

### *THEME OF THE ISSUE: PHYSIOLOGY. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY*

- Koryakin S., Petrushin K., Parshenkov M., Uruskhanova Z., Shchitkova A., Pechnikova E., Demyashkin G.**  
Prognostic value of Charlson comorbidity index in patients admitted with acute myocardial infarction ..... 301
- Demyashkin G., Murtazalieva Z., Pugacheva E., Vadyukhin M., Bimurzaeva M., Milovanova A., Dengina T.**  
Proliferation and apoptosis features of ovarian follicles after local irradiation with electrons and platelet-rich plasma administration ..... 311
- Sudina A.K., Ivanov M.E., Yurin A.M., Makarov A.V., Fatkhudinov T.Kh., Goldstein D.V., Salikhova D.I.**  
Influence of glial progenitor cells on the restoration of sensorimotor deficits in rats after traumatic brain injury ..... 319
- Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Voronkova O.V., Chernyshov N.A., Gusakova S.V.**  
The role of endogenous H<sub>2</sub>S in experimental metabolic syndrome ..... 331
- Yushchuk V.N., Chepurnova N.S., Markelova E.V., Ermolitskaya M.Z., Savchenko A.Yu., Zakharov I.N., Andryushchenko K.A., Barabash P.V., Jia Xing Yan, Meshcheryakova D.A., Plekhova N.G.**  
Proteolysis/antiproteolysis system in apparently healthy men and women of different ages ..... 340

### *HEALTH POLICY AND PUBLIC HEALTH*

- Mikhaylova Yu.V., Sterlikov S.A., Ponomarev S.B., Averyanova E.L.**  
Epidemiological situation of tuberculosis in prisons of the Russian Federation in 2023 ..... 353

### *IMMUNOLOGY*

- Guryanova S.V.**  
Influence of muramylpeptides on the production of chemokines, growth factors, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines ..... 365

### *DERMATOLOGY*

- Pavlovic M., Rokvic Z., Ilic T.**  
Topical timolol maleate in the treatment of mixed and deep infantile hemangiomas: a report of two cases ..... 377
- Kasikhina E.I., Nada A.Y., Ostretsova M.N., Zhukova O.V., Kochetkov M.A., Khanferyan R.A.**  
Monomorphic type clinical features of maculo-papular cutaneous mastocytosis. .... 382

### *OBSTETRICS AND GYNECOLOGY*

- Lisitsyna O.I., Makarova N.P., Krasnyi A.M., Ekimov A.N., Romanov A.Yu., Dolgushina N.V.**  
Mitochondrial DNA copy number level in the culture medium of human embryos as a factor in predicting the onset and prolongation of pregnancy ..... 390



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

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-37358

EDN: FYOJXA

*ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH*

**Kidney morphofunctional features after ascorbic acid administration  
in a model of acute radiation nephropathy**

Sergey Koryakin<sup>1</sup> , Kirill Petrushin<sup>2</sup> , Mikhail Parshenkov<sup>2</sup> , Zhanna Uruskhanova<sup>3</sup> ,  
Anastasiia Shchitkova<sup>3</sup> , Elizabeth Pechnikova<sup>2</sup> , Grigory Demyashkin<sup>1,3</sup>  

<sup>1</sup> National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> RUDN University, Moscow, Russian Federation

 [dr.dga@mail.ru](mailto:dr.dga@mail.ru)

**Abstract. Relevance.** The use of radiation therapy in the treatment of malignant neoplasms actualizes the study of ways to protect healthy tissues from radiation damage. Due to the small number of studies aimed at studying structural and functional changes of kidneys both at their direct irradiation with electrons and at radiotherapy of adjacent organs, it is necessary to carry out complex research. One of the promising directions of radiation nephropathy treatment is the use of antioxidant preparations, in particular ascorbic acid. Aim. Morphofunctional evaluation of the kidney after local electron irradiation and ascorbic acid administration. Materials and Methods. Wistar rats (n=90) were divided into groups: I — control (n=15); II — irradiation, 2 Gy dose (n=15); III — irradiation, 8 Gy dose (n=15); IV — irradiation, 2 Gy dose + ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) (n=15); V — irradiation, 8 Gy dose + ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) (n=15); VI — ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) (n=15). Kidney slides were stained with hematoxylin and eosin. In addition, blood biochemical examination was performed for creatinine, urea nitrogen, C-reactive protein, cystatin C to creatinine ratio

© Koryakin S., Petrushin K., Parshenkov M., Uruskhanova Z., Shchitkova A., Pechnikova E., Demyashkin G., 2024



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

was calculated, and kidney homogenate for malonic dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) concentration levels. *Results and Discussion.* It was found that pre-radiation administration of ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) in the model of acute radiation nephropathy induced by local irradiation with electrons at doses of 2 Gy and 8 Gy contributed to a pronounced reduction of pathomorphologic and biochemical changes. *Conclusion.* Local irradiation with electrons at doses of 2 Gy and 8 Gy leads to the development of radiation nephropathy. At the same time, pre-irradiation administration of ascorbic acid reduces the strength of radiation-induced kidney damage, as well as enhances the efficiency of antioxidant defense.

**Keywords:** radiation nephropathy, electron irradiation, kidney, ascorbic acid, oxidative stress

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

**Author contributions.** Demyashkin Grigory, Koryakin Sergey — concept and design of the study; Petrushin Kirill, Urus Khanova Zhanna, Parshenkov Mikhail, Shchitkova Anastasiia — collection and processing of materials Petrushin Kirill, Urus Khanova Zhanna, Parshenkov Mikhail, Shchitkova Anastasiia, Pechnikova Elizabeth — analysis of the obtained data, writing the text; Demyashkin Grigory — reviewing. All authors made a significant contribution to the development of the concept and manuscript writing, read and approved the final version before publication.

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

**Ethics approval.** All manipulations were performed in accordance with the “International Guidelines for Biomedical Research Using Animals” (EEC, Strasbourg, 1985) and the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. The study was approved by the Local Ethics Committee of the National Medical Radiological Research Center (protocol No. 6 of 27/04/23).

**Acknowledgements** — not applicable.

**Consent for publication** — not applicable.

Received 07.12.2023 Accepted 15.01.2024.

**For citation:** Koryakin S, Petrushin K, Parshenkov M, Urus Khanova Z, Shchitkova A, Pechnikova E, Demyashkin G. Kidney morphofunctional features after ascorbic acid administration in a model of acute radiation nephropathy. *RUDN Journal of Medicine.* 2024;28(3):301–310. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-37358. EDN: FYOJXA.

## Introduction

In the treatment of malignant neoplasms, isolated or complex methods: radiotherapy, chemotherapy and surgery are the key choices. However, early, or late post-radiotherapy complications are possible with radiotherapy [1, 2]. Special attention is paid to the dose-dependent effects of charged particles: electrons and others [3].

Kidneys are the most important organ involved in the maintenance and regulation of fluid, acid-base, and electrolyte metabolism, as well as in the excretion of metabolites, regulation of blood pressure, synthesis of erythropoietin to stimulate red blood cell formation and activation of vitamin D, etc. [4].

Radiation damage to the kidneys leads to both acute and chronic morphofunctional changes in the glomerular apparatus and nephrons, which are accompanied by apoptosis or necrosis of endothelial cells, nephrocytes, etc., and, in late stages, to the development of fibrosis or atrophy. The accumulation of toxic metabolites caused by radiation nephropathy is complicated by chronic renal failure requiring replacement therapy, including dialysis or transplantation [5–7]. Therefore, high importance is attached to the development of effective methods of radiation complications protection [8].

A few studies have revealed that the use of antioxidants helps to reduce the level of post-radiation damage to various organs. One of such drugs is ascorbic acid [9–12].

Thus, due to the small number of studies aimed at studying structural and functional changes in the kidneys, both during their direct irradiation with electrons, and during radiotherapy of malignant neoplasms of neighboring organs, it is necessary to conduct a comprehensive study. It will help to form an idea about dose-dependent effect and pathogenesis of radiation damage of kidneys with determination of optimal mode of radiation therapy. To analyze the effects of radiation damage and recovery, first, of the glomerular apparatus, it is necessary to characterize the main pathomorphological changes, considering the range of toxic effects, to assess the state of the life cycle (proliferation and apoptosis), the degree of fibrosis and others. Separately, it should be emphasized the importance of developing methods of prevention of acute and chronic radiation nephropathy, for example, by the introduction of drugs with a protective effect.

The aim of the study was morphofunctional evaluation of the kidney after local electron irradiation and ascorbic acid administration.

## Material and methods

### Animals for in vivo study

Male Wistar rats (220.3±10.6 g; 9–10 weeks old; n=90) were kept in a vivarium under controlled temperature (22 °C) and light period (12L:12D) with free access to water and standard food. The rats were divided into six experimental groups:

- Group I (n=15) — control;
- Group II (n=15) — animals were subjected to a single local irradiation with electrons at dose of 2 Gy;
- Group III (n=15) — animals were subjected to a single local irradiation with electrons at dose of 8 Gy;
- Group IV (n=15) — before irradiation with electrons at dose of 2 Gy, animals were administered ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg);
- Group V (n=15) — before irradiation with electrons at dose of 8 Gy, the animals were administered ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg);
- Group VI (n=15) — animals were administered ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg).

Animals of all groups were removed from the experiment by administering high doses of anesthetic (intraperitoneal injections of ketamine + xylazine) on the 7th day of the experiment (the start date of the experiment was considered the last day of irradiation). All manipulations were performed in accordance with the “International Guidelines for Biomedical Research Using Animals” (EEC, Strasbourg, 1985) and the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. The study was approved by the Local Ethics Committee of the National Medical Radiological Research Center (protocol No. 6 of 27/04/23).

### Biochemical assays

Blood levels of creatinine, urea nitrogen, C-reactive protein, and the ratio of cystatin C to creatinine were measured. Serum creatinine and urea nitrogen levels were determined using commercial kits (Pars Azemoo, Iran), and cystatin C levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay using a commercial rat kit (Cusabio, China).

### Oxidative stress markers

Kidney homogenate was obtained by homogenizing 1 g of tissue in 4.5 ml of cold potassium buffer (pH 7.4). The solution was then centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was then stored at — 80 °C. The levels of malonic dialdehyde (MDA) as a biomarker of lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) in kidney homogenate were evaluated using ELISA kits (Lifespan Biosciences, USA).

### Morphologic study

After extraction, the appearance of kidneys and the state of parenchyma on the section were evaluated (blood filling, inflammatory changes, atrophy, etc.), weighed (absolute — in grams and relative — in relation to body weight, in %). Kidney fragments were fixed in a solution of buffered formalin, after wiring (histological tissue wiring machine, “Leica Biosystems”, Germany) were cast into paraffin blocks, from which serial sections (3 µm thick) were prepared, dewaxed, dehydrated and stained with Mayer’s hematoxylin and eosin.

Considering that radiation nephropathy is manifested by lesions of tubules (thrombotic microangiopathy, collapse), nephron tubules and interstitial component, which lead to glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis by light microscopy (in 10 random fields of view at magnification x200) we evaluated vacuolization, dystrophy, atrophy of cortical tubules and nephron tubules; inflammation; necrosis.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the computer program SPSS 12.0 for Windows (IBM Analytics, USA). All data are presented in the format of mean  $\pm$  standard deviation (M $\pm$ SD). Kolmogorov-Smirnov test was used for each sample separately to test the hypothesis of normality of distribution of values. In case of normal distribution, Student's t-test was used. Differences between samples were considered statistically significant at a significance level of  $p < 0.05$ , established before the analysis.

### Results and discussion

Body weight of animals of experimental groups decreased in relation to control ( $p < 0.05$ ). The introduction of protectors in groups IV and V gave a statistically significant change in this index compared to groups II and III.

The kidney weight after electron irradiation decreased in relation to the control groups ( $p < 0.05$ ). As a result

of ascorbic acid administration, statistically significant changes in organ weight were observed in groups IV and V compared to groups II and III. In Group VI no statistically significant changes in these parameters were observed compared to the control group (Table 1).

A significant increase was found in the study of serum creatinine level in groups II and III, in comparison with the control group ( $p < 0.05$ ). In group IV and V insignificant changes were observed in comparison with the control ( $p < 0.05$ ). In group VI no statistically significant changes in these parameters were observed compared to the control group (Table 2).

The level of urea nitrogen in serum in all groups exposed to radiation increased significantly compared to the control group ( $p < 0.05$ ). In groups IV and V, the amount of urea nitrogen in blood decreased compared to the groups exposed to electrons (Table 2).

The study revealed a significant increase in the level of C-reactive protein in the blood of groups II and III compared to the control ( $p < 0.05$ ). However, with pre-radiation administration of ascorbic acid the increase in CRP level was insignificant. No statistically significant changes in these parameters were observed in Group VI compared to the control group ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

The ratio of cystatin C to creatinine in serum significantly increased after irradiation at a dose of 8 Gy (group III) compared to the control group ( $p < 0.05$ ). In the other groups no statistically significant changes in these parameters were found ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

Table 1

Animal weight and kidney weight of control and experimental groups

Group	n	Weight of animal, g	Weight of kidney, g
Control	15	220,3 $\pm$ 10,6	2,16 $\pm$ 0,03
Irradiation 2 Gy	15	196,4 $\pm$ 4,7a	1,76 $\pm$ 0,01a
Irradiation 8 Gy	15	181,2 $\pm$ 6,1a	1,62 $\pm$ 0,02a
Irradiation 2 Gy + AA	15	206,4 $\pm$ 2,1b	1,83 $\pm$ 0,02b
Irradiation 8 Gy + AA	15	193,4 $\pm$ 3,4b	1,71 $\pm$ 0,03b
AA	15	226,1 $\pm$ 5,7	2,26 $\pm$ 0,02

Note: Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (M  $\pm$  SD). The Kruskal – Wallis test was used to test the statistical significance of differences between groups. Statistically significant differences compared to the control group are labeled in the Table as Irradiation (a) and Irradiation + AA (b);  $p < 0.05$ .

**Table 2****Levels of creatinine, C-reactive protein, urea nitrogen, cystatin C to creatinine ratio in control and experimental groups**

Group	Creatinine, mg/dL	C-reactive protein, mg/l	Urea nitrogen level, mg/dL	Cyst. C/ creatinin, ng / ml / mg / dl
Control	0,516 ± 0,005	2,11 ± 0,031	16,24 ± 0,27	6,0 ± 0,14
Irradiation 2 Gy	0,563 ± 0,015a	2,81 ± 0,029a	18,56 ± 0,38a	6,15 ± 0,07a
Irradiation 8 Gy	0,641 ± 0,024a	3,54 ± 0,21a	22,1 ± 0,13a	7,18 ± 0,1a
Irradiation 2 Gy + AA	0,524 ± 0,002b	2,63 ± 0,12b	17,18 ± 0,31b	6,20 ± 0,05b
Irradiation 8 Gy + AA	0,537 ± 0,003b	3,17 ± 0,095b	19,75 ± 0,12b	6,74 ± 0,18b
AA	0,519 ± 0,001	2,22 ± 0,134	15,88 ± 0,26	6,03 ± 0,12

Note: Data are presented as mean ± standard deviation (M±SD). The Kruskal – Wallis test was used to test the statistical significance of differences between groups. Statistically significant differences compared to the control group are labeled in the Table as Irradiation (a) and Irradiation + AA (b);  $p < 0.05$ .

In the kidney tissue homogenate after a single irradiation with electrons at doses of 2 Gy and 8 Gy, an increase in the level of malonic dialdehyde (MDA) by 3.1 times and 7.3 times was found, respectively. In addition, in group III, a 31.4 % decrease in superoxide dismutase (SOD) and a 28 % decrease in glutathione (GSH) level were observed compared to the control group ( $p < 0.01$ ). In groups IV and V, insignificant changes in MDA, SOD and GSH values were observed compared to control values. In group VI, no significant changes in SOD and GSH levels were found, but MDA level was insignificantly lower (by 7.1 %) than in the control group ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

At light microscopy of kidney slices of the control group (intact animals) normal histoarchitectonics was observed (Fig.).

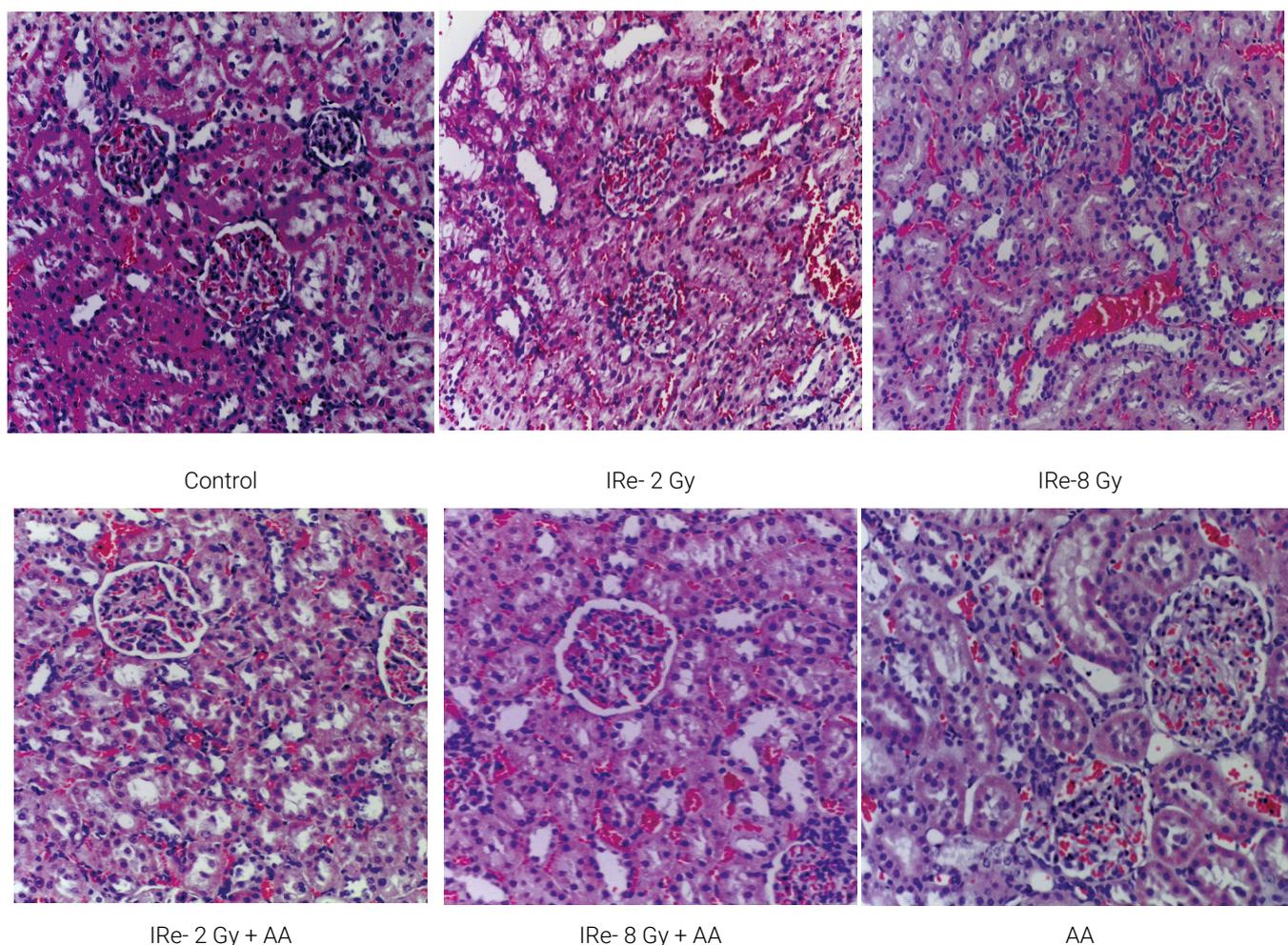
In kidneys after a single local irradiation with electrons at doses of 2 Gy and 8 Gy the number of vascular tubules was reduced, Bowman's capsule was dilated, signs of dystrophic changes in the epithelium of nephron tubules with the appearance of intense pycnotic nuclei in the proximal part, dissociation of macula densa cells, as well as perivascular and paraglomerular edema, abundance of blood vessels were observed. The deepest kidney damage was observed in group III, where damaged tubules accounted for up to 1/5 of the kidney.

At pre-radiation administration of ascorbic acid in groups IV and V, the degree of pathomorphologic changes was reduced. No significant differences in renal structures were found between the groups of ascorbic acid mono-injection and the control group.

**Table 3****Levels of malonic dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in kidney homogenate of control and experimental groups**

Group	MDA	SOD	GSH
Control	11,2 ± 0,3	63,9 ± 4,6	11,2 ± 0,6
Irradiation 2 Gy	34,6 ± 2,7a	53,4 ± 3,1a	9,4 ± 0,5a
Irradiation 8 Gy	79,5 ± 4,2a	42,1 ± 2,2a	8,1 ± 0,3a
Irradiation 2 Gy + AA	26,8 ± 3,1b	57,5 ± 1,7b	10,4 ± 0,7b
Irradiation 8 Gy + AA	38,8 ± 2,1b	48,8 ± 3,6b	9,1 ± 0,3b
AA	10,4 ± 0,4	59,8 ± 2,8	12,8 ± 0,8

Note: Data are presented as mean ± standard deviation (M±SD). The Kruskal – Wallis test was used to test the statistical significance of differences between groups. Statistically significant differences compared to the control group are labeled in the Table as Irradiation (a) and Irradiation + AA (b);  $p < 0.05$ .



**Fig.** Kidneys of control and experimental groups. Hematoxylin and eosin staining, magnification.  $\times 200$ . In kidneys after irradiation at doses 2 Gy and 8 Gy, a decrease in the number of tubules, dystrophic changes in the epithelium of nephron tubules, and abundance of blood vessels were found, especially at dose 8 Gy. At doses 2 Gy + AA and 8 Gy + AA groups the degree of pathomorphologic changes was reduced

Notes: IRe- 2 Gy – experimental group irradiated with electrons at a single focal dose of 2 Gray; IRe- 8 Gy – experimental group irradiated with electrons at a single focal dose of 8 Gray; IRe- 2 Gy + AA and IRe- 8 Gy + AA – experimental groups irradiated with electrons at a single focal dose of 2 and 8 Gray); AA – ascorbic acid.

The present work is devoted to the structural and functional study of the protective effect of ascorbic acid on kidney structures in a model of acute radiation nephropathy induced by single electron irradiation at doses of 2 Gy and 8 Gy.

Radiotherapy, in particular electron irradiation, is one of the effective methods of treatment of malignant tumors of the kidney and retroperitoneum [13, 14]. However, its use is accompanied by the risk of radiation-induced organ damage development,

including two subsequent phases — inflammation and fibrosis [15, 16]. Therefore, the most important task of modern radiation therapy is to improve the safety of radiation exposure and minimize the associated side effects.

To date, there is limited data on the issue of electron irradiation. Most studies in specialized literature are devoted to other types of radiation. For example, after X-, gamma-exposure deep degenerative changes of nephron tubules and tubules are observed, etc. [17, 18].

The observed development of acute vascular reactions after local irradiation with electrons may indicate dysfunction due to damage of the renal tubular apparatus, which are most pronounced after exposure to a dose of 8 Gy. However, the revealed pathomorphologic changes were less pronounced compared to other types of irradiations.

To assess the severity of oxidative stress as well as the independence of antioxidant defense, GSH, MDA and SOD markers were analyzed. Exposure to electrons initiates the formation of reactive oxygen species as well as lipid peroxidation. These biochemical changes are accompanied by an increase in the level of malonic dialdehyde, which reflects the degree of lipid peroxidation, a decrease in the level of superoxide dismutase (one of the key participants of the protective antioxidant system of the body), and changes in the level of glutathione [19–21].

Thus, one of the elements of kidney damage after electron irradiation is oxidative stress caused by the exponential release of large amounts of free oxygen radicals, nitrogen radicals, and lipid peroxidation products. Due to the lack of sufficiently effective methods to protect genetic material from the direct effects of radiation, the fight against oxidative stress turns out to be the key direction of action of protective agents. This concept became a determining factor in the choice of ascorbic acid as a protector.

Ascorbic acid can block the key biochemical components of oxidative stress, preventing the formation of toxic radicals. Protective properties contribute to the protection not only of nephron tubule epithelial cells, but also of endothelial cells of the vascular tubule. In groups IV and V, where ascorbic acid was administered before electron irradiation (at doses 2 Gy and 8 Gy, respectively), a decrease in the degree of pathomorphological changes characteristic of radiation damage to the kidneys was found.

Analysis of malonic dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) levels in kidney homogenate demonstrates a potential protective effect of ascorbic acid to reduce radiation-induced nephropathy.

Thus, based on morphofunctional and biochemical analysis of kidneys after irradiation with electrons

at doses of 2 Gy and 8 Gy and pre-irradiation administration of ascorbic acid we can speak about its possible protective effect, for confirmation of which it is necessary to conduct further studies.

## Conclusion

Local irradiation with electrons at doses of 2 Gy and 8 Gy leads to the development of radiation nephropathy. At the same time, administration of ascorbic acid reduces the strength of radiation-induced kidney damage, as well as enhances the effectiveness of antioxidant defense.

## References/Библиографический список

1. Wild CP, Espina C, Bauld L, Bonanni B, Brenner H, Brown K, Dillner J, Forman D, Kampman E, Nilbert M, Steindorf K, Storm H, Vineis P, Baumann M, Schüz J. Cancer Prevention Europe. *Molecular Oncology*. 2019;13(3):528–534. doi: 10.1002/1878-0261.12455
2. Wei J, Wang B, Wang H, Meng L, Zhao Q, Li X. Radiation-induced normal tissue damage: oxidative stress and epigenetic mechanisms. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2019;3010342. doi: 10.1155/2019/3010342
3. Held KD, Kawamura H, Kaminuma T, Paz AE, Yoshida Y, Liu Q, Willers H, Takahashi A. Effects of Charged Particles on Human Tumor Cells. *Frontiers in Oncology*. 2016;12:23. doi: 10.3389/fonc.2016.00023
4. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN Journal*. 1998;68(5):800, 803–16, 819–20; quiz 821–4. doi: 10.1016/s0001-2092(06)62377-6
5. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017;389(10075):1238–1252. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5
6. Wyld M, Morton RL, Hayen A, Howard K, Webster AC. A systematic review and meta-analysis of utility-based quality of life in chronic kidney disease treatments. *PLoS Medicine*. 2012;9(9):e1001307. doi: 10.1371/journal.pmed.1001307
7. Klaus R, Niyazi M., Lange-Sperandio B. Radiation-induced kidney toxicity: molecular and cellular pathogenesis. *Radiation Oncology*. 2021;16:43. <https://doi.org/10.1186/s13014-021-01764-y>
8. Buchberger B, Scholl K, Krabbe L, Spiller L, Lux B. Radiation exposure by medical X-ray applications. *German Medical Science*. 2022;31:06. doi: 10.3205/000308
9. Cervelli T, Panetta D, Navarra T. A New Natural Antioxidant Mixture Protects against Oxidative and DNA Damage in Endothelial Cell Exposed to Low-Dose Irradiation. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2017;9085947. doi:10.1155/2017/9085947
10. Campesi I, Brunetti A, Capobianco G, Galistu A, Montella A, Ieri F, Franconi F. Sex Differences in X-ray-Induced Endothelial Damage: Effect of Taurine and N-Acetylcysteine. *Antioxidants (Basel)*. 2022;12(1):77. doi: 10.3390/antiox12010077
11. Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Scientific Reports*. 2018;8:16199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34530-4>

12. Popov KA, Bykov IM, Tsybalyuk IY. State of the antioxidant protection system of rat liver in ischemia and reperfusion. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(1):93–104. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-1-93-104
13. Buglione M, Spiazzi L, Urpis M, Baushi L, Avitabile R, Pasinetti N, Borghetti P, Triggiani L, Pedretti S, Saiani F, Fiume A, Greco D, Ciccarelli S, Polonini A, Moretti R, Magrini SM. Light and shadows of a new technique: is photon total-skin irradiation using helical IMRT feasible, less complex and as toxic as the electrons one? *Radiation Oncology*. 2018;13(1):158. doi: 10.1186/s13014-018-1100-4
14. Lee MJ, Son HJ. Electron beam radiotherapy for Kaposi's sarcoma of the toe and web. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2020;16(1):161–163. doi: 10.4103/jcrt.JCRT\_115\_18
15. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Tesei A. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Radiation-Induced Lung Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16):3876. doi:10.3390/ijms20163876
16. Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnyder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2015;141(11):1985–1994. doi:10.1007/s00432-015-1974-6
17. Wegner RE, Abel S, Vemana G, Mao S, Fuhrer R. Utilization of Stereotactic Ablative Body Radiation Therapy for Intact Renal Cell Carcinoma: Trends in Treatment and Predictors of Outcome. *Advances in Radiation Oncology*. 2020;5(1):85–91. https://doi.org/10.1016/j.adro.2019.07.018
18. Abozaid O AR, Moawed FSM, Farrag MA, Abdel Aziz AAA. 4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone modulates redox signal in gamma-irradiation-induced nephrotoxicity in rats. *Free Radical Research*. 2017;51(11–12):943–953. doi.org/10.1080/10715762.2017.1395025
19. Ivanov SV, Ostrovskaya RU, Sorokina AV, Seredenin SB. Analysis of Cytoprotective Properties of Afobazole in Streptozotocin Model of Diabetes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020;169(6):783–786. doi:10.1007/s10517-020-04978-4
20. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *International Journal of Nephrology*. 2012;2012:465897. doi: 10.1155/2012/465897
21. Ognjanović BI, Djordjević NZ, Matić MM, Obradović JM, Mladenović JM, Štajn AŠ, Saičić ZS. Lipid peroxidative damage on Cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(2):1790–1803. doi: 10.3390/ijms13021790

## Морфофункциональные особенности почки после введения аскорбиновой кислоты в модели острой лучевой нефропатии

С.Н. Корякин<sup>1</sup> , К.С. Петрушин<sup>2</sup> , М.А. Паршенков<sup>3</sup> , Ж.Э. Урусханова<sup>3</sup> ,  
А.А. Щиткова<sup>3</sup> , Е.Ф. Печникова<sup>2</sup> , Г.А. Демяшкин<sup>1,3</sup>  

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

 dr.dga@mail.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Использование лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований (ЗНО) актуализирует изучение способов защиты здоровых тканей от радиационного повреждения. Ввиду малого количества исследований, направленных на изучение структурно-функциональных изменений почек, как при их непосредственном облучении электронами, так и при радиотерапии ЗНО соседних органов необходимо проведение комплексного исследования. Одним из перспективных направлений лечения радиационной нефропатии является использование препаратов-антиоксидантов, в частности аскорбиновой кислоты. Цель: морфофункциональная оценка почки после локального облучения электронами и введения аскорбиновой кислоты. Материалы и методы. Крысы Wistar (n=90) были разделены на группы: I – контрольная (n=15); II – облучение, РОД 2 Гр (n=15); III – облучение, РОД 8 Гр (n=15); IV – облучение, РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг/кг) (n=15); V – облучение, РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг/кг) (n=15); VI – аскорбиновая кислота (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг/кг) (n=15). Микропрепараты почек окрашивали гематоксилином и эозином. Кроме того, проводили биохимическое исследование крови на уровень креатинина, азота мочевины, С-реактивного белка, рассчитывали отношение цистатина С к креатинину, а также гомогената почки на уровень концентрации малонового

диальдегида (MDA), супероксиддисмутазы (SOD), а также глутатиона (GSH). Результаты и обсуждение. Исследование показало, что предлучевое введение аскорбиновой кислоты (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг/кг) в модели острой лучевой нефропатии, индуцированной локальным облучением электронами в РОД 2 Гр и РОД 8 Гр, способствовало выраженному снижению патоморфологических и биохимических изменений. Выводы. Локальное облучение электронами в РОД 2 Гр и РОД 8 Гр приводит к развитию радиационной нефропатии. В то же время предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает силу радиационно-индуцированного повреждения почек, а также усиливает эффективность антиоксидантной защиты.

**Ключевые слова:** лучевая нефропатия, облучение электронами, почки, аскорбиновая кислота, оксидативный стресс

**Информация о финансировании.** Авторы заявляют об отсутствии какого-либо финансирования.

**Вклад авторов.** Демяшкин Г.А., Корякин С.Н. – концепция и дизайн исследования; Петрушин К.С., Урусханова Ж.Э., Паршенков М.А., Щиткова А.А. – сбор и обработка материалов; Петрушин К.С., Урусханова Ж.Э., Паршенков М.А., Щиткова А.А., Печникова Е.Ф. – анализ полученных данных, написание текста; Демяшкин Г.А. – рецензирование. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

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

**Этическое утверждение.** Все манипуляции проводили в соответствии с «Международными рекомендациями по биомедицинским исследованиям на животных» (ЕЕС, Страсбург, 1985 г.) и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра радиологии (протокол № 6 от 27.04.23).

**Благодарности** – неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию** – неприменимо.

Поступила 07.12.2023. Принята 15.01.2024.

**Для цитирования:** Koryakin S., Petrushin K., Parshenkov M., Urus Khanova Z., Shchitkova A., Pechnikova E., Demyashkin G. Kidney morphofunctional features after ascorbic acid administration in a model of acute radiation nephropathy // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 301–310. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-37358. EDN: FYOJXA.

*Corresponding author:* Grigory Alexandrovich Demyashkin – PhD, MD, Leading Researcher at the Scientific and Educational Resource Center “Innovative Technologies of Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis” of the RUDN University, Head of the Department of Pathomorphology of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117198, Miklukho-Maklaya St, 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: dr.dga@mail.ru.

Koryakin S. ORCID 0000-0003-0128-4538

Petrushin K. ORCID 0009-0002-1074-6044

Parshenkov M. ORCID 0009-0004-7170-8783

Urus Khanova Zh. ORCID 0009-0009-2291-3680

Shchitkova A. ORCID 0009-0000-0827-6771

Pechnikova E. ORCID 0009-0008-6079-4187

Demyashkin G. ORCID 0000-0001-8447-2600

*Ответственный за переписку:* Григорий Александрович Демяшкин – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного ресурсного центра «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы, заведующий отделом патоморфологии Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава РФ, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6. E-mail: dr.dga@mail.ru

Корякин С.Н. ORCID 0000-0003-0128-4538

Петрушин К.С. ORCID 0009-0002-1074-6044

Паршенков М.А. ORCID 0009-0004-7170-8783

Урусханова Ж.Э. ORCID 0009-0009-2291-3680

Щиткова А.А. ORCID 0009-0000-0827-6771

Печникова Е.Ф. ORCID 0009-0008-6079-4187

Демяшкин Г.А. SPIN 5157-0177; ORCID 0000-0001-8447-2600



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-36985

EDN: FZDMOW

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ORIGINAL RESEARCH

## Proliferation and apoptosis features of ovarian follicles after local irradiation with electrons and platelet-rich plasma administration

Grigory Demyashkin<sup>1,2</sup>  , Zaira Murtazalieva<sup>1</sup> , Ekaterina Pugacheva<sup>1</sup> ,  
Matvey Vadyukhin<sup>3</sup> , Makka Bimurzaeva<sup>3</sup> ,  
Aigul Milovanova<sup>3</sup> , Tamara Dengina<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>RUDN University, Moscow, Russian Federation<sup>2</sup>National Medical Radiological Research Center, Moscow, Russian Federation<sup>3</sup>Sechenov University, Moscow, Russian Federation [dr.dga@mail.ru](mailto:dr.dga@mail.ru)

**Abstract. Relevance.** The ovary is strongly radiosensitive organ. Exposure to ionizing radiation can lead to decreased reproductive function, including infertility. One of the promising regenerative substrates is platelet-rich plasma, which contains a large number of biologically active substances. It is necessary to conduct research in this direction in order to determine the dose-dependent effects of electron irradiation on the cell cycle of oocytes and granulosa cells and to assess the risks of developing radiation-induced ovarian failure. It is important to develop methods for the prevention of acute post-radiation complications, which may include platelet-rich plasma injections. **Aim:** immunohistochemical analysis of ovarian structures' cell cycle after administration of platelet-rich plasma in a model of radiation-induced ovarian failure. **Materials and methods.** We divided the animals (Wistar rats; n=40) into four groups: I — control (n=10); II (n=10) — electron irradiation; III (n=10) — administration of platelet-rich plasma before electron irradiation; IV (n=10) — administration of platelet-rich plasma. A morphological assessment and immunohistochemical (Ki-67, caspase 3) examination of the ovaries were performed. **Results and Discussion.** Number of Ki-67-positive granulosa cells were sharply decreased in group II, but in theca cells the level of expression of this marker exceeded control values. Besides, the number of caspase-3-stained cells increased sharply, mainly due to granulosa cells. The immunohistochemical patterns described were less pronounced in the pre-radiation platelet-rich plasma group. **Conclusion.** Components of platelet-rich plasma have radioprotective properties, maintaining the cell cycle of follicular cells and reducing the depth and range of radiation damage to the ovary after 20 Gy electron exposure, confirmed by the Ki-67 and caspase 3 expression levels.

**Keywords:** ionizing radiation, electrons, ovofolliculogenesis, proliferation, apoptosis

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

© Demyashkin G., Murtazalieva Z., Pugacheva E., Vadyukhin M., Bimurzaeva M., Milovanova A., Dengina T., 2024



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

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

**Author contributions.** Demyashkin G.A., Murtazalieva Z.M. — concept and design of the study; Pugacheva E.N., Milovanova A.B. — collection and processing of materials; Vadyukhin M.A., Bimurzaeva M.B., Dengina T.A. — analysis of the obtained data, writing the text. All authors made a significant contribution to the development of the concept and manuscript writing, read and approved the final version before publication.

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

**Ethics approval.** All manipulations were performed in accordance with the “International Guidelines for Biomedical Research Using Animals” (EEC, Strasbourg, 1985) and the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. The study was approved by the Local Ethics Committee of the National Medical Radiological Research Center (protocol No. 25 of 11/10/23).

**Acknowledgements** — not applicable.

**Consent for publication** — not applicable.

Received 07.12.2023 Accepted 15.01.2024.

**For citation:** Demyashkin G, Murtazalieva Z, Pugacheva E, Vadyukhin M, Bimurzaeva M, Milovanova A, Dengina T. Proliferation and apoptosis features of ovarian follicles after local irradiation with electrons and platelet-rich plasma administration. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):311–318. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-36985. EDN: FZDMOW.

## Introduction

One of the most unfavorable consequences of radiotherapy for malignant neoplasms of the pelvic organs is irradiation of the ovaries, which can lead to the radiation-induced ovarian failure and, as a consequence, infertility [1].

The ovary is very radiosensitive organ [2]. At the molecular level, electron exposure leads to the direct (single and double DNA breaks/crosslinks, chromosomal mutations) and indirect (generation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species and lipid peroxidation products) pathomechanisms activation. The life cycle of oocytes is regulated by proliferation (Ki-67), apoptosis (caspase 3) and pro-apoptosis (p53) factors [3, 4]. There is no effective substrate that can prevent radiation-induced apoptosis in ovarian structures for today, and therefore research into new potential radioprotectors remains relevant.

One of the popular regenerative substrates is platelet-rich plasma (PRP) with a large number of biologically active substances containing in the platelets'  $\alpha$ -granules: insulin-like growth factor-1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblasts growth

factor (FGF), interleukin-8, fibronectin, etc. [5]. These molecules promote tissue repair and remodeling by initiating cell proliferation, angiogenesis, chemotaxis, re-epithelization, extracellular matrix synthesis, etc.

A team of authors at the annual conference of the European Society of Human Reproduction and Embryology presented the results of using PRP as a regenerative substrate in gynecology [6]. Intraovarian administration of PRP in women with perimenopause, premature ovarian failure and poor ovarian response to in vitro fertilization led to morphofunctional restoration of the ovaries with stabilization of anti-müllerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone (FSH) levels and the number of antral follicles within three months after treatment.

Based on the listed positive effects, it is possible to take a PRP as a regenerative substrate for research not only for wounds healing [7], but also in the radiation-induced damage treatment in certain organs such as the ovary [8, 9].

It is necessary to conduct research in this direction in order to determine the dose-dependent effects of electron irradiation on the proliferation / apoptosis ratio of oocytes and granulosa cells, and to assess the risks of developing radiation-induced ovarian failure. Such work is also necessary to determine the optimal doses of electron therapy for pelvic organs cancer to level out

radiation damage. Particularly important are the search and development of substances with radioprotective properties.

*The aim of this study:* immunohistochemical analysis of ovarian structures' cell cycle after administration of platelet-rich plasma in a model of radiation-induced ovarian failure.

## Materials and methods

### Animals for in vivo study

For this research we divided the experimental animals (Wistar rats; n=40) into four groups:

Group I (n=10) — control;

Group II (n=10) — fractional local irradiation with electrons in a summary dose (SD) of 20 Gy;

Group III (n=10) — intraperitoneal administration of leukocyte-poor platelet-rich plasma (LP-PRP) 1 hour before local electron irradiation in a SD of 20 Gy;

Group IV (n=10) — intraperitoneal administration of LP-PRP.

High doses of ketamine + xylazine (i/p) used for animal removing on the 7<sup>th</sup> day and the first experimental day was the day of the last fraction. All manipulations were kept according to the standard rules: Declaration of Helsinki of the World Medical Association and “International Guidelines for Biomedical Research Using Animals” and approved by the protocol No. 25 of 11/10/23 of the Local Ethics Committee of the National Medical Radiological Research Center.

### Morphological study

The ovaries were cut parallel to the sagittal plane (2 mm) and fixed in 10 % formaline after extraction. Then the processing (tissue histological processing apparatus, Leica Biosystems, Germany) were kept under standard conditions and tissues were embedded in paraffin from which serial sections were made (3  $\mu$ m thick). Micropreparations were deparaffinized, dehydrated and then stained for morphological research with hematoxylin and eosin.

Morphological examination was carried out at a magnification of  $\times 400$  in 10 randomly selected fields of view of the light microscope in 5 random sections

per sample. Digital scanned preparations were obtained using a video microscopy system (Leica DM3000 microscope, Germany; DFC450 C camera) and image processing software (Leica Application Suite V. 4.9.0) for morphometric analysis.

### Immunohistochemical (IHC) study

IHC staining was performed according to the standard manufacturer's protocols with monoclonal antibodies to Ki-67 (ThermoFisher, Clone MM1) and Caspase 3 (ThermoFisher, Clone 74T2) as a primary antibodies [10, 11]. A universal two-component HiDef Detection™ HRP Polymer system (Cell Marque, USA), mouse/rabbit anti-IGG, horseradish peroxidase (HRP) and DAB substrate were used to determine secondary antibodies. Antigen unmasking was carried out in a citrate buffer with pH $\approx$ 6.0 in a water bath with a pT Link microprocessor (Dako, Denmark) at a temperature of 95°C for 40 minutes and then by cooling at a temperature of 20°C for 20 minutes. For cell nuclei counterstaining a Mayer's hematoxylin was used. The number of IHC positively stained cells (in %) was counted at a magnification of  $\times 400$  in 10 randomly fields of view.

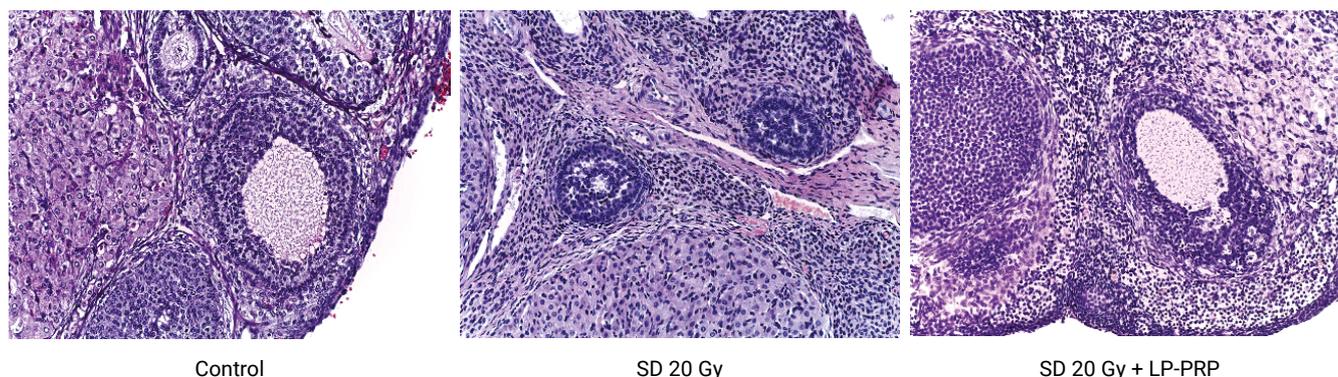
### Statistical analysis

For analytical processing of the research results, the Windows package SPSS 12 (IBM Analytics, USA) statistical program was used. The obtained data are presented as mean  $\pm$  standard error. Comparisons between groups were carried out using statistical packages and differences were considered significant at  $p$ -value  $< 0.05$ .

## Results and discussion

In animals of the control and IV groups, the ovary is covered on the outside with single-layer squamous epithelium (mesothelium), deeper — the tunica albuginea, formed by dense fibrous connective tissue with cords extending from it. The ovarian parenchyma is represented by numerous follicles in different stages of development (Fig. 1).

Fractional local electron irradiation led to the radiation-induced ovarian failure within a week. The number of primordial follicles was sharply reduced, and the number



**Fig. 1.** Ovaries in experimental groups; hematoxylin and eosin stain, magn.  $\times 200$

**Note:** SD – summary dose, LP-PRP – leukocyte poor platelet-rich plasma.

of atretic follicles was increased. In some follicles, oocytes with signs of pyknosis, fragmentation of granulosa cells, and cellular detritus in the antrum were noted. In the stroma of the organ, multiple hemorrhages, stasis of most blood vessels, and proliferation of connective tissue were found compared to the control (Fig. 1).

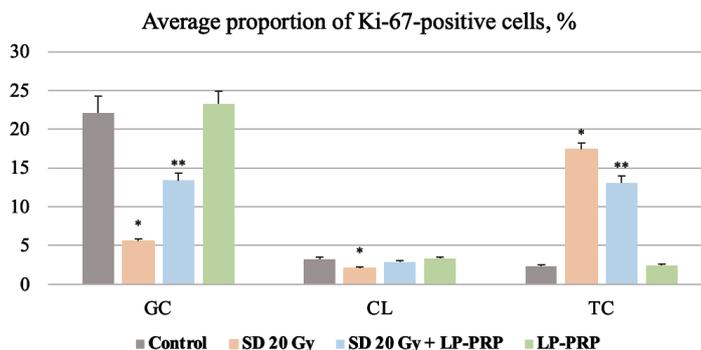
Administration of platelet-rich plasma before irradiation led to a decrease in the degree of radiation-induced ovarian damage compared to the morphological pattern of group II: the primordial and primary follicles counts was slightly reduced unevenly distributed over the area of the ovary; isolated hemorrhages and stasis of red blood cells in vessels' lumen (Fig. 1).

An immunohistochemical study of ovaries irradiated with a summary dose of 20 Gy revealed a decrease in Ki-67 expression level in the follicles (3.9 times) and the corpus

luteum (1.5 times), while the proportion of Ki-67-positive theca cells sharply increased (7.5 times) compared to the control group. Number of caspase-3-immunopositive granulosa cells increased 3.8 times, while practically no differences in the corpus luteum and theca cells were observed compared to the control (Fig. 2–4).

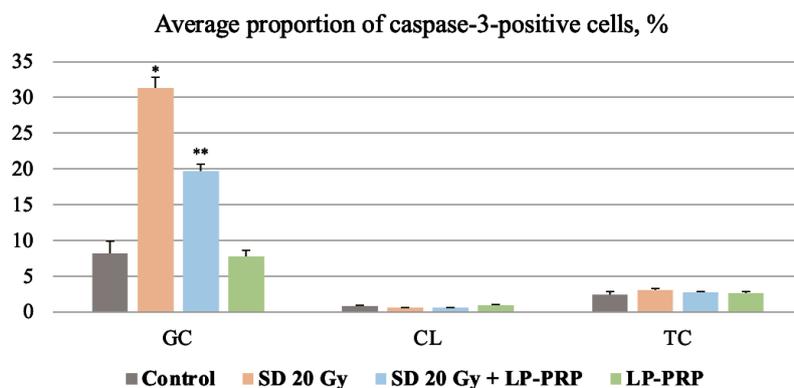
Administration of LP-PRP in group III led to a partial restoration of the proliferative activity of granulosa cells (2.4 times) compared to the irradiation group, however, the proportion of Ki-67-positive theca cells decreased (1.3 times) compared to Group II. A significant decrease (1.6 times) in the expression of caspase-3 in group III was observed only in granulosa cells compared to the results of the irradiation group.

Although, no statistically significant differences were found between the levels of immunoreactivity in group IV compared to the control.



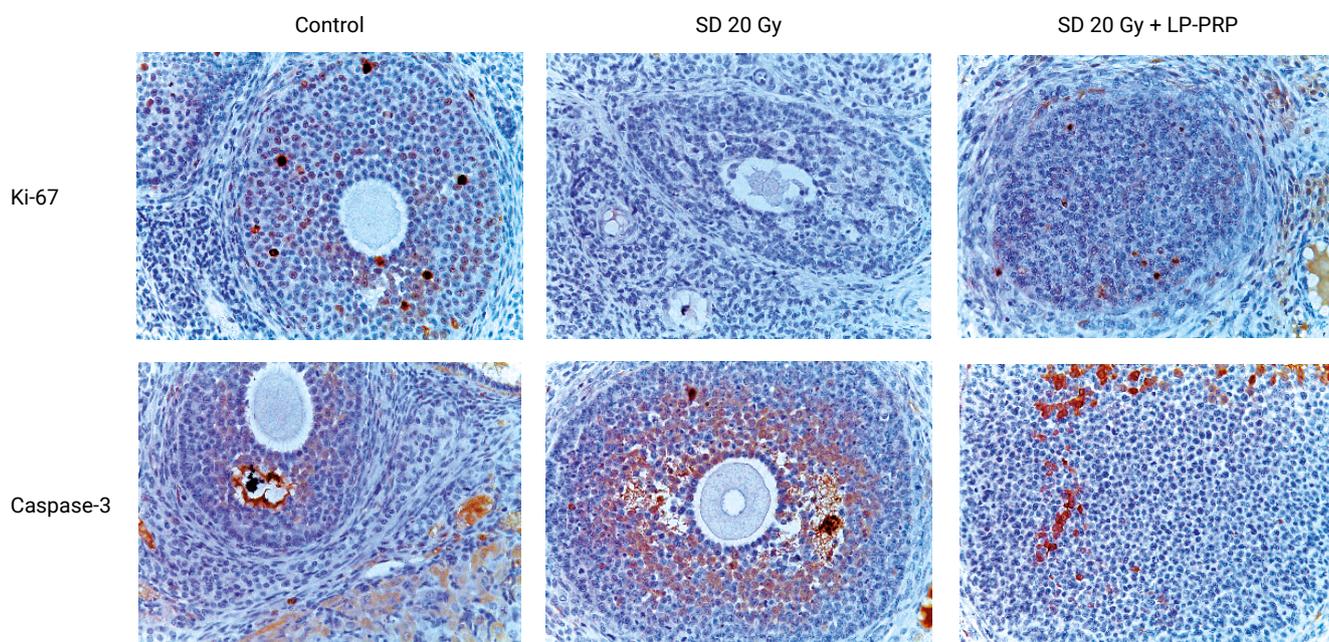
**Fig. 2.** Count of Ki-67-positive cells in experimental ovaries

**Note:** GC – granulosa cells, CL – corpus luteum, TC – theca cells, SD – summary dose. For comparison the Kruskal – Wallis test and the Mann – Whitney U test were performed; \* – significant differences SD 20 Gy vs control ( $p < 0.05$ ). \*\* – significant differences SD 20 Gy vs SD 20 Gy + LP-PRP ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Count of caspase-3-positive cells in experimental ovaries

Note: GC – granulosa cells, CL – corpus luteum, TC – theca cells, SD – summary dose. For comparison the Kruskal – Wallis test and the Mann – Whitney *U* test were performed. \* – significant differences SD 20 Gy vs control ( $p < 0.05$ ). \*\* – significant differences SD 20 Gy vs SD 20 Gy + LP-PRP ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Immunohistochemical analysis of Ki-67 and caspase-3 expression in experimental ovaries, magn.  $\times 400$

Local electron irradiation in group II led to a marked decrease in the Ki-67 expression in granulosa and corpus luteum cells in combination with a sharp increase of caspase-3-stained follicular cells. This is probably because of the effect of electrons on proliferatively active cells which lead to both direct (single and double DNA damages and chromosomal mutations) and indirect (ROS and RNS generation,

lipid peroxidation and molecular water radiolysis) activation of pathways including in post-radiation toxicity in ovaries [12]. Then it leads to a strongly decrease in the primordial follicles number, fibrous connective tissue overgrowth which results in radiation-induced premature ovarian failure with ovarian reserve decrease, early menopause and infertility [13].

Post-radiation cell death most often occurs by apoptosis with activation of the cytochrome *c* and caspase cascade pathways, and in our study, granulosa cells turned out to be the most sensitive to the effects of electron irradiation, which was accompanied by a sharp induction of their apoptosis, confirmed by a high level of caspase-3 expression. Almost similar results were obtained by other researchers [14]. In our opinion a secretory disruption in granulosa cells results to the decreased synthesis of steroid hormones and growth factors. These changes led to the secondary violation of ovofolliculogenesis. In addition, theca cells hyperplasia is also responsible for the secretory follicular dysfunction, and it is the compensatory response to decreased hormone levels in blood.

Due to the fact that electrons lead to a decrease in the synthesis of key growth factors responsible for the restoration and regeneration in ovary, it was advisable to use platelet-rich plasma where the platelets'  $\alpha$ -granules contain high concentrations of biologically substances capable of inducing the follicular cells' regenerative activity and metabolism (through neoangiogenesis stimulation) [15, 16]. Thus, the most important of these in PRP are IGF-1, PDGF, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF, interleukin-8, fibronectin, etc. [17]

These biologically active molecules are the key factors in proliferation and differentiation of many cell types. Due to this it can restore proliferative-apoptotic balance, probably responsible for the regenerative and radioprotective LP-PRP properties discovered in the present study: higher levels of proliferative activity of granulosa cells combined with significantly lower rates caspase-3 immunoreactivity compared with the irradiation group. In addition, pre-irradiation administration of LP-PRP led to a less pronounced increase in the theca cells proliferation, which may indirectly indicate the body's low need for compensatory-adaptive hyperplasia of these cells and the preservation of close to physiological levels of steroid hormones.

Thus, based on histological and immunohistochemical studies, it was occurred that pre-radiation administration of LP-PRP contributed to the restoration of the proliferation/apoptosis ratio of follicles, which

does not exclude the protective effect of this regenerative substrate, which is especially important for the prevention of the development of radiation-induced ovarian failure.

## Conclusion

Components of platelet-rich plasma have radioprotective properties, maintaining the cell cycle of follicular cells and reducing the depth and range of radiation damage to the ovary after 20 Gy electron exposure, confirmed by the Ki-67 and caspase 3 expression levels.

## References/Библиографический список

1. Ahmed Y, Khan AMH, Rao UJ, Shaukat F, Jamil A, Hasan SM et al. Fertility preservation is an imperative goal in the clinical practice of radiation oncology: a narrative review. *Ecancermedicalscience*. 2022;16:1461. doi: 10.3332/ecancer.2022.1461
2. Terenziani M, Piva L, Meazza C. Oophoropexy: a relevant role in preservation of ovarian function after pelvic irradiation. *Fertility and Sterility*. 2009;91(3):935.e15–935.e16. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.029
3. Kaur S, Kurokawa M. Regulation of Oocyte Apoptosis: A View from Gene Knockout Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(2):1345. doi: 10.3390/ijms24021345
4. Zhang W, Huang L, Kong C, Liu J, Luo L, Huang H. Apoptosis of rat ovarian granulosa cells by 2,5-hexanedione in vitro and its relevant gene expression. *Journal of Applied Toxicology*. 2013;33(7):661–669. doi: 10.1002/jat.2714
5. Dawood AS, Salem HA. Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: An appraisal of theory and practice. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2018;45(2):67–74. doi: 10.5653/cerm.2018.45.2.67
6. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Grigoriadis S, Pantou A, Tsioulou P, Maziotis E et al. Reactivating Ovarian Function through Autologous Platelet-Rich Plasma Intraovarian Infusion: Pilot Data on Premature Ovarian Insufficiency, Perimenopausal, Menopausal, and Poor Responder Women. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(6):1809. doi: 10.3390/jcm9061809
7. Xu P, Wu Y, Zhou L. Platelet-rich plasma accelerates skin wound healing by promoting re-epithelialization. *Burns Trauma*. 2020;8: tkaa028. doi:10.1093/burnst/tkaa028
8. Demyashkin GA, Vadyukhin MA, Shekin VI. The Influence of Platelet-Derived Growth Factors on the Proliferation of Germinal Epithelium After Local Irradiation with Electrons. *Journal of Reproduction and Infertility*. 2023;24(2):94–100. doi:10.18502/jri.v24i2.12494
9. Ozcan P, Takmaz T, Tok OE, Islek S, Yigit EN, Ficioglu C. The protective effect of platelet-rich plasma administrated on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. *Journal of Assistant Reproduction and Genetics*. 2020;37(4):865–873. doi: 10.1007/s10815-020-01689-7

10. Kudryavtsev GY, Kudryavtseva LV, Mikhaleva LM, Kudryavtseva YY, Solovyeva NA, Osipov VA, et al. Immunohistochemical study of P53 protein expression in different prostate cancer Gleason grading groups. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(2):145–155. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-145-155
11. Kudryavtsev GY, Kudryavtseva LV, Mikhaleva LM, Babichenko II. Immunohistochemical Study of Tumor Cells Proliferative Activity at Different Graduations of Prostate Cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2019;23(4):364–372. doi: 10.22363/2313-0245-2019-23-4-364-372
12. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdai CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules — mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants Redox Signals*. 2014;21(2):260–292. doi:10.1089/ars.2013.5489
13. An J, Du X, Zhang F, Chen J, Dai J, Huang M et al. Effect of radiotherapy on ovarian function in patients with cervical cancer undergoing radical surgery. *Chinese Journal of Radiation Oncology*. 2019;28(10):753–756.
14. Almeida CP, Ferreira MCF, Silveira CO, Campos JR, Borges IT, Baeta PG et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells—A review. *Cell Biology International*. 2018;42(10):1276–1281. doi: 10.1002/cbin.11036
15. Seckin S, Ramadan H, Mouanness M, Kohansieh M, Merhi Z. Ovarian response to intraovarian platelet-rich plasma (PRP) administration: hypotheses and potential mechanisms of action. *Journal of Assistant Reproduction and Genetics*. 2022;39(1):37–61. doi:10.1007/s10815-021-02385-w
16. Bos-Mikich A, de Oliveira R, Frantz N. Platelet-rich plasma therapy and reproductive medicine. *Journal of Assistant Reproduction and Genetics*. 2018;35(5):753–756. doi: 10.1007/s10815-018-1159-8
17. Sills ES, Wood SH. Autologous activated platelet-rich plasma injection into adult human ovary tissue: molecular mechanism, analysis, and discussion of reproductive response. *Bioscience Rep*. 2019;39(6): BSR20190805. doi: 10.1042/BSR20190805

## Особенности пролиферации и апоптоза овариальных фолликулов после локального облучения электронами и введения плазмы, обогащенной тромбоцитами

Г.А. Демьяшкин<sup>1,2</sup>  , З.М. Муртазалиева<sup>1</sup> , Е.Н. Пугачева<sup>1</sup> , М.А. Вадюхин<sup>3</sup> ,  
М.Б. Бимурзаева<sup>3</sup> , А.Б. Милованова<sup>3</sup> , Т.А. Деньгина<sup>3</sup> 

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

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова, г. Москва, Российская Федерация

 dr.dga@mail.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Яичник является одним из наиболее радиочувствительных органов. Воздействие ионизирующего излучения может приводить к снижению репродуктивной функции вплоть до бесплодия. Одним из многообещающих регенеративных субстратов является плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP), которая содержит в своем составе большое количество биологически активных веществ. Необходимо проведение исследований в этом направлении с целью определения дозозависимых эффектов облучения электронами на пролиферацию и апоптоз ооцитов и клеток гранулезы, а также оценки рисков развития радиационно-индуцированной овариальной недостаточности. Важное значение имеет разработка методов профилактики острых постлучевых осложнений, в рамках которой возможно применение плазмы, обогащенной тромбоцитами. *Цель:* иммуногистохимическая оценка пролиферации и апоптоза структур яичника после введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности. *Материалы и методы.* Крысы породы Вистар (n=40) были поделены на группы: I — контрольная (n=10); II (n=10) — облучение электронами; III (n=10) — введение плазмы, обогащенной тромбоцитами, до облучения электронами; IV (n=10) — введение плазмы, обогащенной тромбоцитами. Проводили морфологическую оценку и иммуногистохимическое исследование яичников с антителами к Ki-67 и каспазе-3. *Результаты и обсуждение.* В фолликулах яичников II-ой группы отмечали резкое снижение доли Ki-67-позитивных гранулезных клеток, однако в тека-клетках уровень экспрессии этого маркера превышал контрольные значения. В то же время, количество каспаза-3-окрашенных клеток резко возрастало, преимущественно за счет гранулезных клеток. Описанные иммуногистохимические паттерны были менее выражены в группе предлучевого введения плазмы,

обогащенной тромбоцитами. **Выводы.** Компоненты плазмы, обогащенной тромбоцитами, обладают радиопротективным свойством, поддерживая пролиферативно-апоптотический баланс фолликулярных клеток и снижая глубину и диапазон лучевого поражения яичника при воздействии фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 20 Гр, подтвержденной уровнями экспрессии Ki-67 и каспазы-3.

**Ключевые слова:** ионизирующее излучение, электроны, овофолликулогенез, пролиферация, апоптоз

**Информация о финансировании.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

**Вклад авторов.** Демяшкин Г.А., Муртазалиева З.М. — концепция и дизайн исследования; Пугачева Е.Н., Милованова А.Б. — сбор и обработка материалов; Вадюхин М.А., Бимурзаева М.Б., Деньгина Т.А. — анализ полученных данных, написание текста. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

**Информация о конфликте интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Все манипуляции проводили в соответствии с «Международными рекомендациями по биомедицинским исследованиям на животных» (ЕЕС, Страсбург, 1985 г.) и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра радиологии (протокол № 25 от 10.11.23).

**Благодарности** — неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию** — неприменимо.

Поступила 07.12.2023. Принята 15.01.2024.

**Для цитирования:** Demyashkin G., Murtazalieva Z., Pugacheva E., Vadyukhin M., Bimurzaeva M., Milovanova A., Dengina T. Proliferation and apoptosis features of ovarian follicles after local irradiation with electrons and platelet-rich plasma administration // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 311–318. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-36985. EDN: FZDMOW.

*Corresponding author:* Grigory Alexandrovich Demyashkin — PhD, MD, Leading Researcher at the Scientific and Educational Resource Center “Innovative Technologies of Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis” of the RUDN University, Head of the Department of Pathomorphology of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117198, Miklukho-Maklaya St, 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: dr.dga@mail.ru.

Demyashkin G. ORCID 0000-0001-8447-2600

Murtazalieva Z. ORCID 0009-0000-2361-7618

Pugacheva E. ORCID 0009-0009-2268-3838

Vadyukhin M. ORCID 0000-0002-6235-1020

Bimurzaeva M. ORCID 0000-0002-3065-0755

Milovanova A. ORCID 0009-0007-9681-5704

Dengina T. ORCID 0009-0002-0651-9711

**Ответственный за переписку:** Григорий Александрович Демяшкин — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного ресурсного центра «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы, заведующий отделом патоморфологии Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава РФ, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6. E-mail: dr.dga@mail.ru

Демяшкин Г. SPIN 5157-0177; ORCID 0000-0001-8447-2600

Муртазалиева З. SPIN 2847-2984; ORCID 0009-0000-2361-7618

Пугачева Е. SPIN 5784-9384; ORCID 0009-0009-2268-3838

Вадюхин М. SPIN 9485-7722; ORCID 0000-0002-6235-1020

Бимурзаева М. SPIN 2637-5894; ORCID 0000-0002-3065-0755

Милованова А. SPIN 9590-8578; ORCID 0009-0007-9681-5704

Деньгина Т. SPIN 5877-3869; ORCID 0009-0002-0651-9711

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-319-330

EDN: BKZHLL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH

## Влияние глиальных клеток-предшественников на восстановление сенсомоторного дефицита у крыс после травмы головного мозга

А.К. Судьина<sup>1</sup>  , М.Э. Иванов<sup>2</sup> , А.М. Юрин<sup>2</sup> , А.В. Макаров<sup>3</sup> , Т.Х. Фатхудинов<sup>4</sup> ,  
Д.В. Гольдштейн<sup>1</sup> , Д.И. Салихова<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова,  
г. Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup>НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва,  
Российская Федерация  
 [nastyasudina@gmail.com](mailto:nastyasudina@gmail.com)

**Аннотация.** *Актуальность.* Поиск новых методов эффективной терапии черепно-мозговой травмы является одной из важных задач современной биомедицины. Одним из многообещающих подходов лечения черепно-мозговой травмы является клеточная терапия. Целью работы является исследование терапевтического эффекта глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на экспериментальной модели черепно-мозговой травмы. *Материалы и методы.* Моделирование черепно-мозговой травмы проводили на самцах половозрелых крыс линии Wistar. Терапевтической группе однократно вводили  $750 \cdot 10^3$  кл/мл глиальных клеток-предшественников объемом 1 мл, группе контроля вводили 1 мл фосфатно-солевого буфера. Введение проводили внутриартериально через 24 часа после травмы. Для анализа терапевтической эффективности проводили МРТ-исследование на 14 сутки, а также тест «Постановка конечности на опору» на 1, 3, 7 и 14 сутки. Клетки глиальных клеток-предшественников окрашивали липофильным красителем РКН26 (Sigma, США), вводили 1 мл крысам с черепно-мозговой травмой ( $750 \cdot 10^3$  клеток/мл), затем проводили гистологическое исследование на 1, 3 и 7 сутки после введения с целью оценки миграции и распространения клеток в тканях головного мозга животных. Измерения объема очага травмы и подсчет количества РКН26-окрашенных клеток проводили с использованием программы ImageJ (Wayne Rasband, Национальный институт психического здоровья, Бетесда, Мэриленд, США). Для статистической обработки использовали программу GraphPad Prism 8.2.0 (GraphPad Software, Inc., США). *Результаты и обсуждение.* Введение ГКП приводило к снижению объема очага. По сравнению с контрольной группой наблюдалось существенное уменьшение сенсомоторного дефицита на 3, 7 и 14 сутки после травмы. Внутриартериальное введение приводило к успешной доставке глиальных клеток-предшественников в ткани головного мозга. На 1 сутки после введения в коре головного мозга, гиппокампе и стриатуме выявлялись клетки. На 3 и 7 сутки после введения клетки не обнаруживались. *Выводы.* Внутриартериальное

© Судьина А.К., Иванов М.Э., Юрин А.М., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И., 2024



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

введение глиальных клеток-предшественников приводит к эффективной миграции клеток в ткани головного мозга. Клеточная терапия глиальными клетками-предшественниками способствует процессам нейровосстановления после черепно-мозговой травмы. Данная терапия является многообещающим методом лечения черепно-мозговой травмы.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, клеточная терапия, глиальные клетки-предшественники, ИПСК

**Информация о финансировании.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме “Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний”.

**Вклад авторов.** Концепция и дизайн исследования — Д.И. Салихова, Т.Х. Фатхудинов, Д.В. Гольдштейн; эксперимент — А.К. Судьина, М.Э. Иванов, А.М. Юрин; подготовка текста статьи — А.К. Судьина; научное редактирование текста — Д.И. Салихова; анализ и дополнение текста статьи — А.В. Макаров. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

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

**Этическое утверждение.** Все эксперименты на животных проводили в соответствии с руководящими принципами хельсинкской декларации и директивой 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях, Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года и были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына (Протокол № 38(14)).

**Благодарности** — неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию** — неприменимо.

Поступила 07.02.2024. Принята 11.03.2024.

**Для цитирования:** Судьина А.К., Иванов М.Э., Юрин А.М., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И. Влияние глиальных клеток-предшественников на восстановление сенсомоторного дефицита у крыс после травмы головного мозга // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 319–330. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-319-330. EDN: BKZHLL.

## Influence of glial progenitor cells on the restoration of sensorimotor deficits in rats after traumatic brain injury

Anastasiia K. Sudina<sup>1</sup>  , Mikhail E. Ivanov<sup>2</sup> , Alexander M. Yurin<sup>2</sup> , Andrey V. Makarov<sup>3</sup> , Timur Kh. Fatkhudinov<sup>4</sup> , Dmitry V. Goldstein<sup>1</sup> , Diana I. Salikhova<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup>Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russian Federation

 nastyasudina@gmail.com

**Abstract. Relevance.** The search for new methods of effective therapy for traumatic brain injury is one of the important tasks of modern biomedicine. One promising approach for treating traumatic brain injury is cell therapy. The aim of the work is to study the therapeutic effect of glial progenitor cells derived from induced pluripotent stromal cells in an experimental

model of traumatic brain injury. *Materials and Methods*. Modeling of traumatic brain injury was carried out on mature male Wistar rats. The therapeutic group was administered a single dose of  $750 \cdot 10^3$  cells/ml glial progenitor cells with a volume of 1 ml, and the control group — 1 ml of phosphate-buffered saline. Administration was carried out intra-arterially 24 hours after injury. To analyze the therapeutic effectiveness, an MRI study was performed on the 14th day, as well as a limb-placing test on the 1st, 3rd, 7th and 14th days. Histological examination was carried out on days 1, 3 and 7 after administration to assess the migration and distribution of stained cells (concentration  $750 \cdot 10^3$  cells/ml) by lipophilic dye PKH26 (Sigma, USA) at the rat's brain tissues after traumatic brain injury. Measurements of injury volume and counts of PKH26-stained cells were performed using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 8.2.0 program (GraphPad Software, Inc., USA). *Results and Discussion*. Administration of GPCs led to decreasing the damage volume. Significant decrease in sensorimotor deficit was observed on days 3, 7 and 14 after injury compared with the control group. Intra-arterial administration resulted in successful delivery of glial progenitor cells to brain tissue. Cells were detected in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum on day 1, and were not observed on days 3 and 7 after administration. *Conclusion*. Intra-arterial administration of GPCs leads to efficient migration of cells into brain tissue. Glial progenitor cells therapy promotes neurorecovery processes after traumatic brain injury. This therapy is a promising treatment for traumatic brain injury.

**Keywords:** traumatic brain injury, cell therapy, glial progenitor cells, iPSCs

**Funding.** The work was financial supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project No. KBK 075 0110 47 1 S7 24600 621) on the topic “Development of new drugs for the treatment of neurological diseases”.

**Author contributions.** Concept and design of the study — Diana I. Salikhova, Timur Kh. Fatkhudinov, Dmitry V. Goldstein; experiment — Anastasiia K. Sudina, Mikhail E. Ivanov, Alexander M. Yurin; preparation of the article text — Anastasiia K. Sudina; scientific editing of the text — Diana I. Salikhova; analysis and addition of the article text — Andrey V. Makarov. All authors made a significant contribution to the development of the concept and manuscript writing, read and approved the final version before publication.

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

**Ethics approval.** All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes of the European Parliament and the Council of the European Union of 22 September 2010 and were approved by the ethics committee of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky National Research Centre of Surgery» (Protocol No. 38(14)).

**Acknowledgments** — not applicable.

**Consent for publication** — not applicable.

Received 07.02.2024 Accepted 11.03.2024.

**For citation:** Sudina AK, Ivanov ME, Yurin AM, Makarov AV, Fatkhudinov TKh, Goldstein DV, Salikhova DI. Influence of glial progenitor cells on the restoration of sensorimotor deficits in rats after traumatic brain injury. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):319—330. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-319-330. EDN: BKZHLL.

## Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) — это заболевание, характеризующееся структурным или функциональным нарушением мозговой ткани, возникающим в результате механического воздействия, и приводящее к серьезным физическим, когнитивным и эмоциональным расстройствам. По разным оценкам

ежегодно во всем мире от случаев ЧМТ страдают от 27 до 69 миллионов человек [1–4]. Патофизиология ЧМТ является комплексным процессом, который включает в себя не только первичное механическое повреждение, но и широкий спектр вторичных патологических реакций. Первичная стадия ЧМТ характеризуется физическим повреждением головного мозга

и сопровождается некрозом нервной и сосудистой тканей. Вторичные патофизиологические процессы включают в себя отёк мозга, оксидативный стресс и растяжение аксонов, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  и эксайтотоксической гибели нейронов [5, 6].

Помимо перечисленных процессов, в ЦНС после ЧМТ также происходит инициация воспалительных и иммунных реакций, что способствует нарушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), усилению травмы и в дальнейшем может привести к когнитивным дисфункциям [7]. Несмотря на интенсивные исследования в данной области, эффективной терапии ЧМТ до сих пор не существует в силу сложности патомеханизма заболевания и его гетерогенности. Большинство терапий в настоящее время направлены на снижение вторичного травматизма. Трансплантация стволовых клеток различного типа является одним из перспективных методов терапии ЧМТ, направленных на регенерацию и восстановление поврежденных тканей. Трансплантированные клетки способны либо непосредственно интегрироваться в поврежденные ткани и замещать погибшие нейроны, либо восстанавливать пораженные участки ткани, продуцируя биологически активные молекулы: цитокины, ростовые факторы, нейротрофические факторы.

Глиальные клетки-предшественники (ГКП) формируются из нейральных стволовых клеток субвентрикулярной зоны желудочков и зубчатой извилины гиппокампа и широко распространяются по всей ЦНС, проникая как в серое, так и в белое вещество [8, 9]. Глиальные клетки выполняют множество важнейших функций в центральной нервной системе. Они обеспечивают механическую поддержку нейронов и снабжают их необходимыми веществами, включая глюкозу и другие метаболиты, участвуют в процессах регенерации и восстановления нервной ткани после травм, в формировании и реорганизации синапсов, влияя на процессы памяти и обучения. При этом астроциты, один из типов глиальных клеток, регулируют ионный состав внеклеточной среды, удаляют излишки ионов и нейротрансмиттеров, а также поддерживают гомеостаз мозга. Развитие технологии получения

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) позволяет получить различные типы клеток, происходящих из трех зародышевых листов, на разных стадиях дифференцировки, в том числе глиальные клетки-предшественники, которые в дальнейшем можно использовать для клеточной терапии [10]. Хотя применение ГКП для терапии черепно-мозговых травм пока не изучено, есть литературные данные об их использовании при лечении инсульта белого вещества головного мозга с положительным эффектом [11, 12].

На сегодняшний день существует несколько способов доставки биомедицинских клеточных продуктов. Процедура интерцеребрального введения стволовых клеток обычно требует хирургического вмешательства, которое может быть связано с риском осложнений, таких как инфекции или повреждения тканей, хотя при данном способе введения трансплантат достигает мозга без преодоления гематоэнцефалического барьера, что позволяет стволовым клеткам воздействовать непосредственно на поврежденные участки мозга [13]. Внутривенное введение стволовых клеток является распространённым малоинвазивным способом доставки и не требует сложных манипуляций, но при этом этот способ малоэффективен при терапии неврологических заболеваний, так как стволовые клетки захватываются такими органами, как печень и селезенка, прежде чем они достигнут целевых тканей [14]. Внутриаартериальная инфузия стволовых клеток обеспечивает более целенаправленную доставку и может обойти значительный легочный эффект первого прохождения, наблюдаемый при внутривенной инфузии.

Данное исследование направлено на изучение терапевтического эффекта при внутриаартериальном введении ГКП, полученных из ИПСК, на модели черепно-мозговой травмы.

## Материалы и методы

### Клеточная культура

Глиальные клетки-предшественники были получены ранее путём поэтапной дифференцировки

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека [15,16]. Кратко, для получения ИПСК использовали набор для репрограммирования CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), затем проводили дифференцировку в нейральные стволовые клетки (НСК) с последующим получением глиальной линии. В ходе дифференцировки в глиальные клетки-предшественники НСК приобрели веретенообразную морфологию с неровным контуром и крупными овальными ядрами, а также экспрессировали белки S100B и GFAP. ГКП культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 1 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco, США), 1 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), 1 % N-2 («ПанЭко», Россия), 50 ед/мл пеницилин-стрептомицин («ПанЭко», Россия), 20 нг/мл EGF (Peprotech, США), 20 нг/мл CNTF (Peprotech, США) при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере. В качестве подложки использовали матригель (Corning, США) [16].

### Лабораторные животные

Эксперимент проводили на половозрелых самцах крыс линии Wistar весом 300–400 граммов (n = 14) для изучения терапевтической эффективности и (n = 6) для изучения распределения клеток. Животных содержали при соблюдении цикла освещения день-ночь при постоянно поддерживаемой температуре воздуха 24 °С. После моделирования ЧМТ животных держали отдельно в течение 2 недель.

### Описание экспериментальной модели черепно-мозговой травмы

Все операции проводили под ингаляционным наркозом с использованием изофлюрана в концентрации 3 % на воздушной смеси на этапе введения и 1,5–2,5 % на этапе поддержания анестезии. Перед моделированием область операции предварительно обезболивали с помощью инфльтрационной анестезии лидокаином.

Для создания модели травмы применяли метод дозированного контузионного повреждения открытого мозга [17]. Животным выщипывали участок кожи

на голове и фиксировали голову в стереотаксической рамке. Затем выполняли срединный продольный разрез, и с помощью фрезы диаметром 5 мм в черепе просверливали отверстие над левым полушарием в области локализации сенсомоторной коры по координатам 2,5 мм латеральнее и 1,5 мм каудальнее брегмы. Устройство для нанесения травмы располагали над твердой мозговой оболочкой так, чтобы боёк находился на глубине 3 мм ниже костей черепа. В отверстие в черепе над твердой мозговой оболочкой помещали цилиндрический боёк. Для нанесения травмы на боёк сбрасывали груз массой 50 г с высоты 10 см. После раны дезинфицировали и ушивали простым узловым швом. Животное перемещали в теплую клетку с поддержанием температуры тела, регулируемым с помощью инфракрасной лампы и термостата.

### Протокол экспериментального исследования

Через 24 часа после моделирования ЧМТ животных случайным образом разделяли на 2 группы: 1-я — крысы с ЧМТ (n = 7 для оценки терапевтической эффективности и 6 для изучения распределения клеток), которым вводили внутриаартериально (в/а) 1 мл фосфатно-солевого буфера, группа контроля (ЧМТ); 2-я — крысы с ЧМТ (n = 7 для оценки терапевтической эффективности и 6 для изучения распределения клеток), которым в/а вводили 1 мл ГКП с концентрацией  $750 \cdot 10^3$  клеток/мл, терапевтическая группа (ЧМТ+ГКП). Клетки вводили в правую общую сонную артерию в течение 40 секунд, как описано ранее [18]. Срок наблюдения составил 2 недели. До операции, на 1, 3, 7 и 14 сутки после моделирования ЧМТ проводили оценку неврологического статуса (n = 7). Для оценки объема очага повреждения на 14 сутки животным проводили МРТ диагностику (n = 7).

### Оценка терапевтической эффективности

Для оценки терапевтической эффективности использовали данные МРТ и неврологического статуса животных. На 14-е сутки проводили МРТ-исследование на аппарате BioSpec 70/30 (Bruker, Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл и градиентной

системой 105 мТл/м. Животных вводили в состояние наркоза с помощью изофлюрана, смешанного с воздухом в концентрации 3 %. Во время исследования поддерживали концентрацию 1,5–2,5 %. Затем животных помещали в устройство позиционирования, оснащённое системами стереотаксиса и терморегуляции. В ходе МРТ-исследования были получены T2-взвешенные изображения (T2ВИ) высокого разрешения для оценки объема повреждения. Объем очага травмы мозга был измерен с помощью программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, Национальный институт психического здоровья, Бетесда, Мэриленд, США) по T2-взвешенным изображениям. Зону повреждения обводили вручную: учитывали гипоинтенсивные участки изображения, отражающие отсутствие ткани вследствие травмы и гиперинтенсивные участки изображения, отражающие некроз в области травмы. Объем зоны травмы рассчитывался по формуле:

$$V = (S_1 + \dots + S_n) * (h + d),$$

где  $S_1$  — площадь первого среза,  $S_n$  — площадь среза  $n$  (мм<sup>2</sup>),  $h$  — толщина среза (мм),  $d$  — межсрезовый промежуток (мм). Для оценки сенсомоторного восстановления конечностей крыс (неврологического статуса) использовали тест «Постановка конечности на опору» с использованием оборудования «НПК Открытая Наука» (Россия) по методике [19]. Этот тест состоит из семи испытаний, направленных на определение уровня восстановления чувствительности и двигательной функции передних и задних конечностей в ответ на тактильные и проприоцептивные стимулы. Оценка качества выполнения теста проводили по трехбалльной шкале, где 2 означало полное выполнение испытания, 1 — выполнение с задержкой более 2 секунд и/или не полное выполнение, 0 — невыполнение теста. Баллы, полученные по результатам семи испытаний, суммируются.

### Мечение ГКП флуоресцентным красителем

Для оценки миграции и распространения ГКП по тканям головного мозга клетки маркировали липофильным красителем PKH26 (Sigma, США). Вкратце, клеточную суспензию инкубировали в 1 мл реагента-разбавителя С. Далее смешивали с равным

объемом раствора для мечения (4 нМ PKH26) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Процесс окрашивания прекращали добавлением 2 мл фетальной бычьей сыворотки. Клетки дважды промывали раствором Хенкса («ПанЭко», Россия) и ресуспендировали в физиологическом растворе с фосфатным буфером («ПанЭко», Россия). Клеточную суспензию  $750 \times 10^3$  клеток/мл вводили в/а животным и проводили гистологическое исследование на 1, 3 и 7 сутки.

### Гистологическое исследование

Животных выводили из эксперимента на 1, 3 и 7 сутки после введения ГКП. После эвтаназии летальной дозой изофлурана проводили декапитацию, мозг извлекали и фиксировали в 10 % формалине 24 часа. Затем извлеченный мозг инкубировали в 30 % растворе сахарозы в течение суток. Полученные образцы тканей заключали в среду PolyFreeze Tissue Freezing Medium (Sigma, США) и замораживали на  $-20$  °С. Далее готовили криосрезы толщиной 4–5 мкм на криостате Leica CM1950 (Leica Microsystems, Германия). Подготовленные образцы инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) и 1 % бычьим сывороточным альбумином («ПанЭко», Россия) в течение часа и проводили окрашивание первичными антителами против anti-Mitochondria Human (1:100, ab92824) (Abcam, UK) в течение ночи при  $+4$  °С. После проводили отмывку первичных антител и проводили окрашивание вторичными антителами Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 555 (1:600, A-21422) (ThermoFisher, США) в течение 60 минут в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали раствором DAPI 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. Изображения очага травмы, гиппокампа и стриатума получали с использованием люминесцентного инвертированного микроскопа Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия), объективами HC PL Apo VC  $20 \times / 0,75$  и HC PL Apo  $40 \times / 1,10$  W (Leica Microsystems, Германия). Количественную оценку клеток проводили с помощью программы ImageJ

(Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Среднюю плотность оценивали путем подсчета положительно окрашенных клеток, которые затем нормализовали на квадратный мм среза, количество изображений для каждой зоны головного мозга  $n = 10$ .

### Статистический анализ

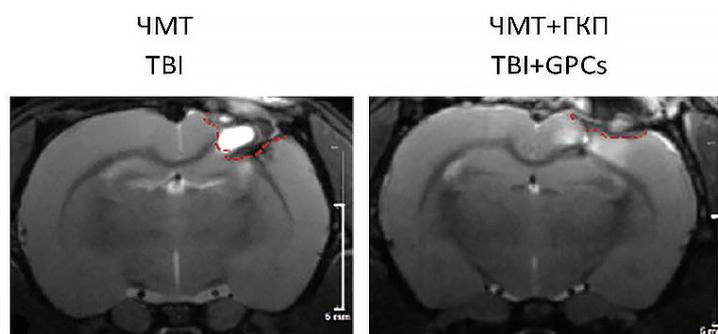
Статистический анализ данных проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.2.0 (GraphPad Software, Inc., США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение данных МРТ проводили с помощью t-теста. Данные теста «Постановка конечности на опору» анализировали с помощью непараметрического

критерия Крускала-Уоллиса (ANOVA on ranks). Полученные данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение для МРТ и в виде медиан и квартилей для теста «Постановка конечности на опору». При  $p < 0,05$  различия считали статистически достоверными.

### Результаты и обсуждение

#### Оценка объема очага повреждения

ЧМТ приводила к обширным повреждениям мозга в области сенсомоторной коры (рис. 1). Для оценки объема повреждения проводили МРТ исследование на 14 сутки после моделирования. Клеточная терапия приводила к снижению объема повреждения в 1,5 раза (таблица 1).



**Рис. 1.** Репрезентативные МРТ-изображения объема повреждения при моделировании ЧМТ на 14 сутки эксперимента

*Примечание:* Красной пунктирной линией обозначена зона повреждения. ЧМТ – группа контроля, ЧМТ+ГКП – терапевтическая группа. Масштабная линейка: 5 мм.

**Fig.1.** Representative MRI images of the damage volume during modeling of TBI on the 14th day of the experiment. The red dotted line indicates the damaged area

*Note:* TBI is the control group, TBI+GPCs is the therapeutic group. Scale bar: 5 mm.

**Таблица 1**  
Сравнение объема повреждений у контрольной и терапевтической группы

Параметры	Объем повреждения, (мм <sup>3</sup> ), 14 сутки
ЧМТ	54,9 $\pm$ 15,8
ЧМТ+ГКП	36,6 $\pm$ 7,6*

*Примечание:* Данные проанализированы с использованием t-теста и представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение (\* –  $p < 0,05$ ). ЧМТ – группа контроля, ЧМТ + ГКП – терапевтическая группа.

**Table 1**  
Comparison of damage volume between control and treatment groups

Parameters	Damage volume, (mm <sup>3</sup> ), 14 day
TBI	54,9 $\pm$ 15,8
TBI+GPCs	36,6 $\pm$ 7,6*

*Note:* Data were analyzed using t-test and presented as mean  $\pm$  standard deviation (\* –  $p < 0.05$ ). TBI is the control group, TBI + GPCs is the therapeutic group.

### Оценка неврологического статуса

ЧМТ вызывала сенсомоторный дефицит, выявляемый тестом «Постановка конечности на опору». Животные до моделирования травмы набирали в этом тесте 14 баллов, тогда как на 1 сутки у животных в обеих группах неврологический статус снижался и статистически значимо не отличался.

Однократное введение ГКП способствовало уменьшению выраженности сенсомоторного дефицита, начиная с 3 суток эксперимента, и продолжалось на протяжении всего исследуемого периода. На 3, 7 и 14 сутки баллы у животных с терапией были в 2 раза выше, чем в группе контроля (таблица 2).

Таблица 2

Влияние ГКП на неврологический статус животных

Сутки Группа	0 (до ЧМТ)	1 (после ЧМТ)	3 (после ЧМТ)	7 (после ЧМТ)	14 (после ЧМТ)
ЧМТ (баллы)	14,0 (Q25 = 13,0–Q75 = 14,0)	1,5 (Q25 = 1–Q75 = 2)	2,0 (Q25 = 1,75–Q75 = 3,25)	5,0 (Q25 = 2,75–Q75 = 9,25)	8,0 (Q25 = 3–Q75 = 8)
ЧМТ+ГПК (баллы)	13,0 (Q25 = 12–Q75 = 14)	2,0 (Q25 = 1–Q75 = 3)	7,0 (Q25 = 4,5–Q75=9)*	10,0 (Q25=8–Q75=13)*	10,0 (Q25=9–Q75=11)*

Примечание: Результаты теста «Постановка конечности на опору»: данные проанализированы с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса (ANOVA on ranks) и представлены в виде медиан и квартилей (\* –  $p < 0,05$ ). ЧМТ – группа контроля, ЧМТ+ГПК – терапевтическая группа.

Table 2

Effect of GPCs on the neurological status of animals

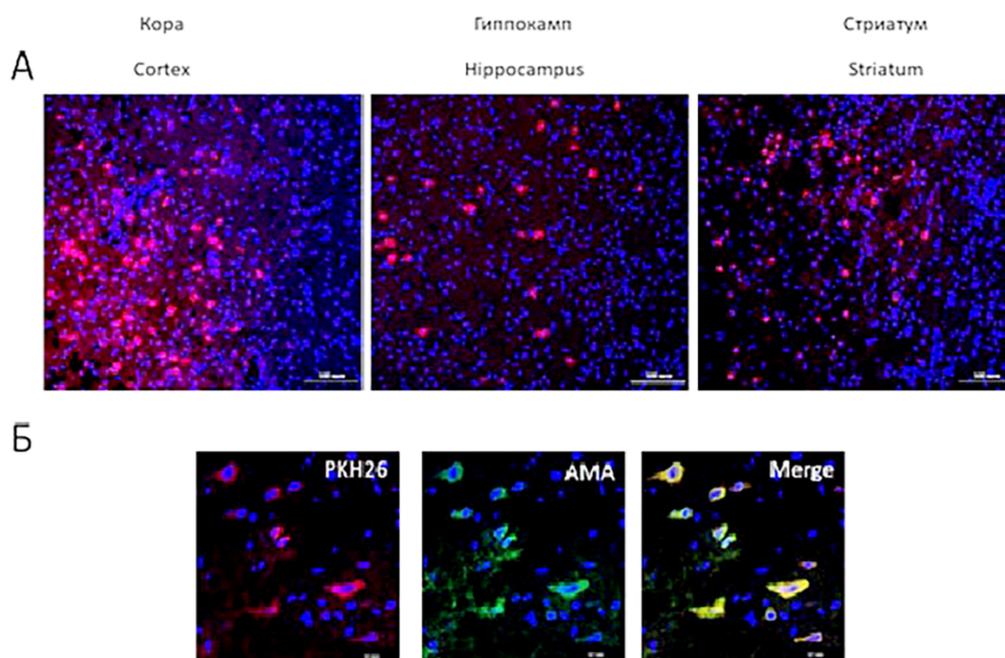
Day Group	0 (before TBI)	1 (after TBI)	3 (after TBI)	7 (after TBI)	14 (after TBI)
TBI (points)	14,0 (Q25 = 13,0–Q75 = 14,0)	1,5 (Q25 = 1–Q75 = 2)	2,0 (Q25 = 1,75–Q75 = 3,25)	5,0 (Q25 = 2,75–Q75 = 9,25)	8,0 (Q25 = 3–Q75 = 8)
TBI+GPCs (points)	13,0 (Q25 = 12–Q75 = 14)	2,0 (Q25 = 1–Q75 = 3)	7,0 (Q25 = 4,5–Q75 = 9)*	10,0 (Q25 = 8–Q75 = 13)*	10,0 (Q25 = 9–Q75 = 11)*

Note: Results of the limb placement test: the data were analyzed using the nonparametric Kruskal – Wallis test (ANOVA on ranks) and are presented as medians and quartiles; (\* –  $p < 0.05$ ). TBI is the control group, TBI+GPCs is the therapeutic group.

### Миграция ГКП в тканях головного мозга

После инъекции в правую сонную общую артерию на 1 сутки на гистологических срезах тканей головного мозга были выявлены ГКП с помощью метки липофильным красителем РКН26 в сочетании с иммуногистохимическим окрашиванием антителами против митохондрий человека (рис. 2Б). Клетки распределялись в ипсилатеральном полушарии:

большинство клеток располагалось в моторной коре — непосредственно в области травмы, а также вокруг нее; гиппокампе и в стриатуме (рис. 2А). Наибольшее количество клеток было выявлено в области травмы —  $363,5 \pm 42,82$  клетки/мм<sup>2</sup>, в области гиппокампа —  $163,3 \pm 50,8$  клеток/мм<sup>2</sup> и стриатума —  $163,2 \pm 68,09$  клеток/мм<sup>2</sup>. На 3 и 7 сутки ГКП в тканях головного мозга крыс ГКП не обнаружены.



**Рис. 2.** Гистологическое исследование миграции ГКП в головном мозге

*Примечание:* А. ГКП выявляются в тканях головного мозга крысы на 1 сутки после внутриартериального введения в ипсилатеральном полушарии в зоне коры, гиппокампа и стриатума. ГКП окрашены PKH26 (красный) и ядра клеток (синий). Масштабная линейка: 100 мкм. Б. Трансплантированные клетки окрашены PKH26 (красный) и anti-Mitochondria Human (AMA) (зеленый). Масштабная линейка: 50 мкм.

**Fig. 2.** Histological study of GPCs migration in the brain

*Note:* A. GPCs are detected in rat brain tissue on day 1 after intra-arterial administration in the ipsilateral hemisphere in the zone of the cortex, hippocampus, and striatum. GPCs are stained with PKH26 (red) and cell nuclei (blue). Scale bar: 100  $\mu$ m. B. Transplanted cells were stained with PKH26 (red) and anti-Mitochondria Human (AMA) (green). Scale bar: 50  $\mu$ m.

Клеточная терапия ЧМТ представляет собой перспективный метод лечения, направленный на восстановление поврежденной нервной ткани и улучшение функциональных исходов у пациентов. ЧМТ характеризуется сложной патофизиологией, включающей первичные повреждения, связанные с непосредственным физическим воздействием на нервную ткань, и вторичные процессы, такие как воспаление и нейродегенерация, которые развиваются в течение длительного времени после травмы.

В то время как клеточная терапия в острой фазе ЧМТ затруднена из-за выраженных патологических изменений в нервной ткани, отсроченное введение стволовых/прогениторных клеток (через 24 часа и более после травмы) кажется более подходящим способом терапии ввиду приближенности

к клинической практике. В этот период основные некротические процессы уже завершены, и клетки могут оказать терапевтический эффект на восстановительные процессы. В данной работе было проведено внутриартериальное введение ГКП, полученных из ИПСК, через 24 часа после моделирования ЧМТ. Исследование показало, что введение ГКП улучшало неврологический статус животных после ЧМТ. При этом данная терапия статистически достоверно снижала объем повреждения сенсомоторной коры.

Очевидно, что данный эффект обусловлен быстрой и эффективной доставкой ГКП в ткань поврежденного полушария и их накоплением в зоне травмы, что было показано при гистологическом исследовании через сутки после в/а введения. При этом известно, что глиальные клетки способны се-

кретировать широкий спектр биологически активных веществ, обладающих нейропротективными свойствами. В проведенных ранее исследованиях было показано, что ГКП, полученные из ИПСК, секретируют белки, регулирующие апоптоз (белок теплового шока 70 кДа 4 (HSPA4), гремлин (GREM1)), обладающие противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами (антитромбин III, галектин-1 (LGALS1)), повышающие выживаемость нейронов в условиях окислительного стресса (пероксиредоксин-1 (PRDX1)), а также нейротрофины (нейротрофический фактор мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста нервов (NGF) [16, 20]. Скорее всего положительные эффекты ГКП связаны с паракринным действием этих соединений, так как на 3 сутки эксперимента происходила полная элиминация трансплантированных клеток без интеграции в ткани реципиента. Возможно, еще одним механизмом терапевтического действия может быть юстакринное взаимодействие ГКП с клетками головного мозга [21, 22].

Одним из наиболее изученных типов клеточной терапии для ЧМТ является использование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). Они также способны секретировать широкий спектр биологически активных веществ, обладающих иммуномодулирующими и нейротрофическими свойствами. Исследования на животных моделях показали, что внутривенное или в/а введение ММСК через 24 часа после ЧМТ способствует улучшению неврологических функций и уменьшению воспалительных процессов [23–25]. Причем метод в/а обеспечивал более эффективную доставку клеток в поврежденную область мозга и способствовал более выраженному терапевтическому эффекту [26, 27]. При этом не все исследования показывали выраженное уменьшение объема очага повреждения [25]. В некоторых клинических испытаниях на людях также применяются ММСК для лечения ЧМТ. Например, введение ММСК пациентам с тяжелыми травмами мозга показывает потенциальные улучшения в неврологическом статусе и когнитивных функциях [28, 29]. Еще одним

типом клеток, используемым для терапии ЧМТ, являются нейральные стволовые клетки (НСК). В отличие от МСК, они могут дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, что делает этот тип клеток более подходящим для терапии неврологических заболеваний. Введение НСК животным с ЧМТ оказывает положительное влияние на функционирование головного мозга и приводит к уменьшению объема повреждения [30–32]. Ранние фазы клинических испытаний НСК для оценки их безопасности и эффективности при лечении ЧМТ показали положительные тенденции в восстановлении неврологических функций [28, 33–35].

Клинические исследования клеточной терапии для ЧМТ находятся на ранних стадиях, однако предварительные результаты дают надежду на то, что этот метод может значительно улучшить исходы лечения. Применение клеточной терапии в рамках трансляционной медицины потенциально способно повысить выживаемость и качество жизни пациентов с ЧМТ, обеспечивая новые возможности для нейропротекции и регенерации нервной ткани.

## Выводы

Полученные данные свидетельствуют, что клеточная терапия с использованием ГКП, полученных из ИПСК, является многообещающим методом лечения ЧМТ. Направленное введение ГКП в мозг при помощи внутриартериального введения в каротидные артерии приводило к эффективной миграции клеток в ткани головного мозга. Клеточная терапия ГКП способствовало процессам нейровосстановления и уменьшению объема очага повреждения у животных с ЧМТ. Предположительно, терапевтические эффекты ГКП основаны на механизме паракринного действия секретируемых ими факторов. Использование такого подхода в области трансляционной медицины может значительно увеличить выживаемость и улучшить реабилитацию пациентов после черепно-мозговой травмы, однако требуется более детальное изучение механизмов терапевтического действия ГКП.

## References/Библиографический список

- James SL, Theadom A, Ellenbogen RG, Bannick MS, Montjoy-Venning W, Lucchesi LR et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019;18(1):56–87. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30415-0
- Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrivastava MG, Rubiano AM, Rosenfeld JV, Park KB. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2019;130(4):1080–1097. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352
- Zhou Y, Shao A, Xu W, Wu H, Deng Y. Advance of Stem Cell Treatment for Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:301. doi: 10.3389/fncel.2019.00301
- Shevelev OA, Smolensky AV, Petrova MV, Mengistu EM, Mengitsu AA, Vatsik-Gorodetskaya MV, Khanakhmedova UG, Menzhurenkova DN, Vesnin SG, Goryanin II. Diagnostics and prevention of sports-related traumatic brain injury complication. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(2):254–264. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-2-254-264
- Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic Axonal Injury Induces Calcium Influx Modulated by Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(6):1923–1930. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-06-01923.2001
- Barkhoudarian G, Hovda DA, Giza CC. The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury — an Update. *Physical medicine and rehabilitation of North America*. 2016;27(2):373–393. doi: 10.1016/j.pmr.2016.01.003
- Jackson ML, Srivastava AK, Cox CS. Preclinical progenitor cell therapy in traumatic brain injury: a meta-analysis. *The Journal of Surgical Research*. 2017;214:38–48. doi: 10.1016/j.jss.2017.02.078
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*. 1998;4(11):1313–1317. doi: 10.1038/3305
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in Adult Mammals: Some Progress and Problems. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(3):619–623. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00619.2002
- Goldman SA, Nedergaard M, Windrem MS. Glial progenitor cell-based treatment and modeling of neurological disease. *Science*. 2012;338(6106):491–495. doi: 10.1126/science.1218071.
- Llorente IL, Xie Y, Hatanaka EA, Cinkompumin J, Miller DR, Lin Y, Lowry WE, Carmichael ST. Patient-derived glial enriched progenitors repair functional deficits due to white matter stroke and vascular dementia in rodents. *Science translational medicine*. 2021;13(590):1–18. doi: 10.1126/scitranslmed.aaz6747
- Porambo M, Phillips AW, Marx J, Ternes K, Arauz E, Pletnikov M, Wilson MA, Rothstein JD, Johnston MV, Fatemi A. Transplanted glial restricted precursor cells improve neurobehavioral and neuropathological outcomes in a mouse model of neonatal white matter injury despite limited cell survival. *Glia*. 2015;63(3):452–465. doi: 10.1002/glia.22764
- Muir KW, Bulters D, Willmot M, Sprigg N, Dixit A, Ward N, Tyrrell P, Majid A, Dunn L, Bath P, Howell J, Stroemer P, Pollock K, Sinden J. Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2020;91(4):396–401. doi: 10.1136/jnnp-2019-322515
- Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Gubskiy I, Sukhinich K, Melnikov P, Chekhonin V, Yarygin K, Goldshtein D, Salikhova D. Comparative study of the efficacy of intra-arterial and intravenous transplantation of human induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells in experimental stroke. *Peer J*. 2023;11:16358. doi: 10.7717/peerj.16358
- Namestnikova DD, Gubskiy IL, Salikhova DI, Leonov GE, Sukhinich KK, Melnikov PA, Vishnevskiy DA, Cherkasova EA, Gabashvili AN, Bukharova TB, Burunova VV, Fatkhudinov TKh, Chekhonin VP, Gubsky LV, Kiselev SL, Goldstein DV, Yarygin KN. Therapeutic efficacy of intra-arterial administration of induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells in acute experimental ischemic stroke in rats. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019;21(1):153–164. doi:10.15825/1995-1191-2019-1-153-164 (In Russian). [Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Salikhova D.I., Leonov G.E., Sukhinich K.K., Melnikov P.A., Vishnevskiy D.A., Cherkashova E.A., Gabashvili A.N., Bukharova T.B., Burunova V.V., Fatkhudinov T.Kh., Chekhonin V.P., Gubsky L.V., Kiselev S.L., Goldshtein D.V., Yarygin K.N. Терапевтическая эффективность введения нейтральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при остром экспериментальном ишемическом инсульте у крыс // Регенеративная медицина и клеточные технологии. 2019. Т. 21, вып. 1. С. 153–164].
- Salikhova D, Bukharova T, Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Nikitina M, Gubskiy I, Akopyan G, Elchaninov A, Midiber K, Bulatenko N, Mokrousova V, Makarov A, Yarygin K, Chekhonin V, Mikhaleva L, Fatkhudinov T, Goldshtein D. Therapeutic Effects of hiPSC-Derived Glial and Neuronal Progenitor Cells-Conditioned Medium in Experimental Ischemic Stroke in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4694. doi: 10.3390/ijms22094694
- Ma X, Aravind A, Pfister BJ, Chandra N, Haorah J. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(8):5332–5345. doi: 10.1007/s12035-018-1454-5
- Chua JY, Pendharkar A V, Wang N, Choi R, Andres RH, Gaeta X, Zhang J, Moseley ME, Guzman R. Intra-Arterial Injection of Neural Stem Cells using a Microneedle Technique does not Cause Microembolic Strokes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011;31(5):1263–1271. doi: 10.1038/jcbfm.2010.213
- Ryck MD, Reempts, Borgers M, Wauquier A, Janssen A. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*. 1989;20(10):1383–1390. doi:10.1161/01.str.20.10.1383
- Salikhova DI, Golovicheva VV, Fatkhudinov TK, Shevtsova YA. Therapeutic Efficiency of Proteins Secreted by Glial Progenitor Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(15):12341. doi:10.3390/ijms241512341
- Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *The Lancet: Neurology*. 2002;1(2):92–100. doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00040-6
- Harrell CR, Volarevic A, Volaveric V. Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells on Cognitive Deficits. *Handbook of Stem Cell Therapy*. 2022;413–436. doi.org/10.1007/978-981-19-2655-6\_15
- Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial Administration of Marrow Stromal Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2004;18(8):813–819. doi: 10.1089/089771501316919175
- Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2003;53(3):697–703. doi: 10.1227/01.neu.0000079333.61863.a
- Silachev DN, Plotnikov EYu, Babenko VA, Danilina TI, Zorova LD, Pevzner IB, Zorov DB, Sukhikh GT. Intra-Arterial

- Administration of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Promotes Functional Recovery of the Brain After Traumatic Brain Injury. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;159(4):528–533. doi: 10.1007/s10517-015-3009-3 (In Russian). [Силачѳв Д.Н., Плотников Е.Ю., Бабенко В.А., Данилина Д.И., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Зоров Д.Б., Сухих Г.Т. Внутриаpтериальное Введение Мультипотентных Мезенхимных Стромальных Клеток Усиливает Функциональное Восстановление Головного Мозга После Черепно Мозговой Травмы // Клеточные Технологии В Биологии И Медицине. 2015. № . 2. С. 71–77.]
26. Harting M, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2009;110(6):1189–1197. doi: 10.3171/2008.9.JNS08158
27. Lundberg J, Södersten E, Sundström E, Le Blanc K, Andersson T, Hermanson O, Holmin S. Targeted intra-arterial transplantation of stem cells to the injured CNS is more effective than intravenous administration: engraftment is dependent on cell type and adhesion molecule expression. *Cell Transplantation*. 2012;21(1):333–43. doi: 10.3727/096368911X576036
28. Bonilla C, Zurita M. Cell-based therapies for traumatic brain injury: therapeutic treatments and clinical trials. *Biomedicines*. 2021;9(6):669. doi: 10.3390/biomedicines9060669
29. Carbonara M, Fossi F, Zoerle T, Ortolano F, Moro F, Pischiutta F, Rainer ER, Stocchetti N. Neuroprotection in traumatic brain injury: Mesenchymal stromal cells can potentially overcome some limitations of previous clinical trials. *Frontiers in Neurology*. 2018;24:9:885. doi: 10.3389/fneur.2018.00885
30. Riess P, Zhang C, Saatman KE, Laurer HL, Longhi LG, Raghupathi R, Lenzlinger PM, Lifshitz J, Boockvar J, Neugebauer E, Snyder EY, McIntosh TK. Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2002;51(4):1043–1052. doi: 10.1097/00006123-200210000-00035
31. Shindo T, Matsumoto Y, Wang Q, Nobuyuki K, Tamiya T, Nagao S. Differences in the neuronal survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury. *The journal of medical investigation: JMI*. 2006;53(1–2):42–51. doi: 10.2152/jmi.53.42
32. Xiong LL, Hu Y, Zhang P, Zhang Z, Li LH, Gao GD, Zhou XF, Wang TH. Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery from Traumatic Brain Injury via Brain Derived Neurotrophic Factor-Mediated Neuroplasticity. *Molecular Neurobiology*. 2018;55(3):2696–2711. doi: 10.1007/s12035-017-0551-1
33. Saboori M, Riazi A, Taji M, Yadegafar G. Traumatic Brain Injury and Stem Cell Treatments: A Review of Recent 10 Years Clinical Trials. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2024;239:108219. doi: 10.1016/j.clineuro.2024.108219
34. Cox CS, Juranek J, Bedi S. Clinical trials in traumatic brain injury: cellular therapy and outcome measures. *Transfusion*. 2019;59:858–868. doi: 10.1111/trf.14834
35. Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. Traumatic brain injury and stem cells: An overview of clinical trials, the current treatments and future therapeutic approaches. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(3):137. doi: 10.3390/medicina56030137

**Ответственный за переписку:** Судьина Анастасия Константиновна — младший научный сотрудник, лаборатория генетики стволовых клеток, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», Российская Федерация, 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: nastyasudina@gmail.com

Судьина А.К. SPIN 5225-7878; ORCID 0000-0003-3531-7684

Иванов М.Э. SPIN 8333-9897; ORCID 0000-0002-5010-3919

Юрин А.М. ORCID 0009-0000-9909-0971

Макаров А.В. SPIN 3534-3764; ORCID 0000-0002-5847-567X

Фатхудинов Т.Х. SPIN 7919-8430; ORCID 0000-0002-6498-5764

Гольдштейн Д.В. SPIN 7714-9099; ORCID 0000-0003-2438-1605

Салихова Д.И. SPIN 1436-5027; ORCID 0000-0001-7842-7635

**Corresponding author:** Sudina Anastasiia Konstantinovna — junior researcher, stem cell genetics laboratory, Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moskvorechie str., 1, Moscow, Russian Federation. E-mail: nastyasudina@gmail.com

Sudina A.K. ORCID 0000-0003-3531-7684

Ivanov M.E. ORCID 0000-0002-5010-3919

Yurin A.M. ORCID 0009-0000-9909-0971

Makarov A.V. ORCID 0000-0002-5847-567X

Fatkhudinov T.H. ORCID 0000-0002-6498-5764

Goldstein D.V. ORCID 0000-0003-2438-1605

Salikhova D.I. ORCID 0000-0001-7842-7635



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-331-339

EDN: AFKRGE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH

## Роль эндогенного H<sub>2</sub>S при экспериментальном метаболическом синдроме

Ю.Г. Бирулина  , В.В. Иванов , Е.Е. Буйко , О.В. Воронкова ,  
Н.А. Чернышов , С.В. Гусакова 

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Российская Федерация  
 birulina20@yandex.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Газовый трансмиттер сероводород (H<sub>2</sub>S) известен как сигнальная молекула, участвующая в регуляции многих клеточных функций в норме и при патологических состояниях. В последнее время активно изучаются биологические эффекты H<sub>2</sub>S при ожирении и метаболическом синдроме (МС) с позиции перспективы разработки фармакологических агентов, обеспечивающих патогенетически обоснованную коррекцию данного синдрома и ассоциированных с ним заболеваний. *Цель работы* состояла в изучении роли эндогенно продуцируемого H<sub>2</sub>S в патогенезе метаболических нарушений при экспериментальном МС. *Материалы и методы.* Моделирование диет-индуцированного МС выполняли на крысах-самцах Wistar с помощью высокожировой и высокоуглеводной диеты. У животных определяли массу тела и жировой ткани. В сыворотке крови измеряли показатели углеводного и липидного обмена с использованием наборов реагентов. В жировой ткани фотометрически анализировали уровень активных форм кислорода (АФК) и восстановленного глутатиона (GSH). Концентрацию H<sub>2</sub>S в сыворотке крови, жировой ткани и интенсивность его продукции регистрировали спектрофотометрически. *Результаты и обсуждение.* Установлено, что на фоне гипергликемии и инсулинорезистентности снижалась концентрация H<sub>2</sub>S в сыворотке крови, жировой ткани и интенсивность продукции H<sub>2</sub>S клетками жировой ткани. Выявлена отрицательная корреляция между содержанием H<sub>2</sub>S, его продукцией в жировой ткани крыс и массой висцеральной жировой ткани. Обнаружена отрицательная взаимосвязь между концентрацией глюкозы, инсулина, лептина, АФК и уровнем H<sub>2</sub>S в сыворотке крови и жировой ткани. Напротив, повышение GSH в жировой ткани прямо коррелировало с увеличением уровня H<sub>2</sub>S в сыворотке крови и клетках жировой ткани. *Выводы.* Несмотря на всестороннее изучение регуляторного действия H<sub>2</sub>S на функцию клеток-мишеней, сведения о его значимости в развитии и прогрессировании МС весьма неоднозначны и продолжают раскрываться. В нашей работе показано, что в условиях метаболической патологии происходит снижение сывороточной концентрации H<sub>2</sub>S и его продукции в жировой ткани, которое коррелирует с развитием ожирения, гипергликемии, инсулинемии, лептинемии, нарушением редокс-статуса.

**Ключевые слова:** сероводород, метаболический синдром, ожирение, гипергликемия, инсулинорезистентность

**Информация о финансировании.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

© Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Воронкова О.В., Чернышов Н.А., Гусакова С.В., 2024



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

**Вклад авторов.** Концепция и дизайн исследования, написание рукописи — Ю.Г. Бирулина, В.В. Иванов; эксперимент, статистический анализ — Е.Е. Буйко, Н.А. Чернышов; анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи — О.В. Воронкова, С.В. Гусакова. 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.** Все эксперименты выполнены в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990), а также Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция 2000 г.). Исследования были одобрены Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 25.04.2022 г.), г. Томск, Россия.

**Благодарности** — неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию** — неприменимо.

Поступила 18.03.2024 Принята 13.05.2024

**Для цитирования:** Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Воронкова О.В., Чернышов Н.А., Гусакова С.В. Роль эндогенного H<sub>2</sub>S при экспериментальном метаболическом синдроме // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 331–339. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-331-339. EDN: AFKRGE.

## The role of endogenous H<sub>2</sub>S in experimental metabolic syndrome

Julia G. Birulina  , Vladimir V. Ivanov , Evgeny E. Buyko , Olga V. Voronkova ,  
Nikita A. Chernyshov , Svetlana V. Gusakova 

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation  
 birulina20@yandex.ru

**Abstract. Relevance.** The gasotransmitter hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) is a well-known signalling molecule that is involved in the regulation of a wide range of cellular functions in both health and disease. Its biological effects in obesity and metabolic syndrome (MetS) have been investigated. It is a promising pharmacological target for the correction of MetS and associated diseases. *The aim* of this study is to investigate the role of endogenously produced H<sub>2</sub>S in the pathogenesis of metabolic disorders in experimental Met S. *Materials and Methods.* A high-fat and high-carbohydrate diet was used to induce MS in male Wistar rats. The body and adipose tissue weights of the animals were determined. The animals body and adipose tissue weights were measured. Indicators of carbohydrate and lipid metabolism in the blood serum were determined with the use of reagent kits. Additionally, the levels of reactive oxygen species (ROS) and reduced glutathione (GSH) were analyzed in adipose tissue through photometric analysis. The concentration of H<sub>2</sub>S in blood serum and adipose tissue, as well as H<sub>2</sub>S production by adipocytes, was measured spectrophotometrically. *Results and Discussion.* H<sub>2</sub>S concentrations in blood serum, adipose tissue and adipocyte H<sub>2</sub>S production were found to decrease in animals with hyperglycaemia and insulin resistance. Additionally, a negative correlation was observed between the H<sub>2</sub>S content and production in the adipose tissue of rats with the mass of visceral adipose tissue. Furthermore, a negative relationship was found between the concentrations of glucose, insulin, leptin, ROS and the level of H<sub>2</sub>S in blood serum and adipose tissue. In contrast, the increase in glutathione (GSH) in adipocytes was directly correlated with the increase in hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in serum and adipose tissue cells. *Conclusions.* The regulatory effect of H<sub>2</sub>S on target

cell function has been extensively studied. However, its role in the development and progression of MetS remains unclear. Our work demonstrates that under conditions of metabolic pathology, there is a decrease in the serum concentration of H<sub>2</sub>S and its production in adipose tissue. This decrease correlates with the development of obesity, hyperglycemia, insulinemia, leptinemia, and redox imbalance.

**Keywords:** hydrogen sulfide, metabolic syndrome, obesity, hyperglycemia, insulin resistance

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

**Author contributions.** Julia G. Birulina, Vladimir V. Ivanov — research concept and design development, manuscript writing; Evgeny E. Buyko, Nikita A. Chernyshov — experimental part, statistical data processing; Olga V. Voronkova, Svetlana V. Gusakova — data interpretation and analysis, manuscript editing. All authors made a significant contribution to the development of the concept, research, and preparation of the manuscript, read and approved the final version before publication.

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

**Ethics approval.** All experiments were performed in accordance with the Geneva Convention “International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals” (Geneva, 1990), as well as the World Medical Association Declaration of Helsinki on the Humane Treatment of Animals (2000 edition). The study was approved by the by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Siberian State Medical University (protocol No. 1, 25.04.2022), Tomsk, Russia.

**Acknowledgements** — not applicable.

**Consent for publication** — not applicable.

Received 18.03.2024 Accepted 13.05.2024

**For citation.** Birulina JG, Ivanov VV, Buyko EE, Voronkova OV, Chernyshov NA, Gusakova SV. The role of endogenous H<sub>2</sub>S in experimental metabolic syndrome. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):331–339. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-331-339. EDN: AFKRGE.

## Введение

Газотрансмиттеры представляют собой небольшие молекулы эндогенного газа, которые обладают способностью диффундировать в клетки для взаимодействия со своими мишенями и индуцировать ряд внутриклеточных реакций сигнальной трансдукции [1, 2]. Ввиду высокой растворимости в липидах для проникновения через клеточные мембраны газотрансмиттерам не требуется взаимодействие с рецепторами плазматической мембраны, равно как и участие специального переносчика для передачи сигнала.

Сероводород (H<sub>2</sub>S), наряду с оксидом азота (NO) и оксидом углерода (CO), также принадлежит к семейству газомедиаторов [3]. Несмотря на то, что H<sub>2</sub>S был ранее известен как токсичный газ, многочисленные экспериментальные исследования показывают,

что он производится ферментативно во многих клетках организма млекопитающих и человека, а также опосредует ряд таких физиологических функций, как регуляция сосудистого тонуса, ангиогенез [4], нейротрансмиссия [5], продукция инсулина [6], апоптоз, воспалительная реакция [7] и др. Показано, что свои эффекты H<sub>2</sub>S реализует через широкий спектр сигнальных молекул, реагируя с супероксид-анионом, перекисью водорода, пероксинитритом, тиоловыми производными и NO, воздействует на различные транскрипционные факторы (Nrf2, FoxO3, NF-κB) [8, 9], а также ионные каналы [4] в клетках-мишенях.

В то же время в литературе имеются сведения о том, что при различных патологических состояниях, ассоциированных с нарушением обмена веществ, таких как сахарный диабет, ожирение,

метаболический синдром (МС), происходит нарушение продукции и снижение биодоступности  $H_2S$  [10, 11]. Метаболические и гемодинамические нарушения, возникающие при МС, вероятно, оказывают влияние на баланс данного газомедиатора и механизмы его воздействия. Противоречивость данных об эффекторном потенциале  $H_2S$  при МС, а также ассоциированных с ним социально-значимых заболеваний, делает его перспективным объектом для исследований. Существующие на сегодняшний день сведения о влиянии  $H_2S$  на клеточный гомеостаз позволяют рассматривать его в качестве возможного претендента на роль протекторного биологического агента.

Таким образом, целью исследования явилось изучение роли эндогенно продуцируемого  $H_2S$  в патогенезе метаболических нарушений при экспериментальном МС.

### Материал и методы

Для исследований было выполнено моделирование МС в эксперименте на крысах-самцах Wistar (25 самцов, возраст на начало исследования 6 недель) по ранее описанной методике [12]. Протокол исследования был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 25.04.2022 г.). Крысы контрольной группы получали стандартный корм («Чара», Ассортимент-Агро, РФ). Крысы опытной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете (ВЖВУД) с заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы. Животных выводили из эксперимента  $CO_2$ -эвтаназией. Выполняли забор крови из сердца, которую затем центрифугировали (2000 g, 10 мин) для получения сыворотки. Извлекали и взвешивали висцеральную жировую ткань. В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы (Glucose-TR, Chronolab, Испания), инсулина (Insulin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, США), лептина (Rat Leptin ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР). Рассчитывали индекс

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) по формуле: (сывороточный инсулин)  $\times$  (сывороточная глюкоза)/22,5.

Концентрацию  $H_2S$  в сыворотке крови определяли по методике Li L. и соавт. [13], для чего аликвоты сыворотки смешивали с дистиллированной водой, ацетатом цинка (1 % масс./об.), трихлоруксусной кислотой (10 % масс./об.), N, N-диметил-п-фенилендиаминсульфат (20 мкмоль/л) и  $FeCl_3$  (30 мкмоль/л) в 7,2 М HCl. Через 15 мин измеряли оптическую плотность при 670 нм с использованием микропланшетного ридера Tecan Infinite200 (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария). Концентрацию  $H_2S$  в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой с использованием NaHS (1–250 мкмоль/л) и выражали в мкмоль/л. Для определения содержания и интенсивности продукции  $H_2S$  в жировой ткани крыс по методу Mok Y.Y.P. и соавт. [14] фрагменты ткани гомогенизировали в ледяном 100 ммоль/л калий-фосфатном буфере (pH 7,4). К гомогенату добавляли L-цистеин (10 ммоль/л), пиридоксаль-5'-фосфат (2 ммоль/л), физиологический раствор и инкубировали в течение 30 мин (37 °C). Затем вводили ацетат цинка (1 % масс./об.) и добавляли раствор трихлоруксусной кислоты (10 % масс./об.). Для определения базального (исходного) уровня  $H_2S$  в тканях трихлоруксусную кислоту вносили непосредственно перед добавлением L-цистеина. Затем добавляли N, N-диметил-п-фенилендиаминсульфат (20 мкмоль/л) и  $FeCl_3$  (30 мкмоль/л) в 7,2 М HCl. После инкубации смеси в течение 10 мин (37 °C) пробы центрифугировали при 10000 об/мин, отбирали супернатант и измеряли оптическую плотность (670 нм) с помощью микропланшетного ридера (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария). Концентрацию  $H_2S$  рассчитывали по калибровочной кривой NaHS (1–250 мкмоль/л), результаты выражали в нмоль образовавшегося  $H_2S$ /мг белка. Активность продукции  $H_2S$  выражали в нмоль  $H_2S$ /(мин\*мг белка).

Содержание активных форм кислорода (АФК) в жировой ткани определяли флуоресцентным методом [15] с помощью микропланшетного ри-

дера (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария). Для определения содержания восстановленного глутатиона (GSH) жировую ткань (100 мг) гомогенизировали в 5 % растворе сульфосалициловой кислоты, затем центрифугировали при 15000 g (2–4°C, 15 мин), собирали супернатант и фотометрировали на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, РФ). Количественное определение белка выполняли в реакции с бичинхоновой кислотой (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, США). Результаты представляли в нмоль/мг белка.

Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $\pm SD$ ), неподчиняющиеся — медианы ( $Me$ ), 25-го и 75-го перцентилей ( $Q_{25}$ ;  $Q_{75}$ ). Анализ различий между выборками выполняли при помощи  $t$ -критерия Стьюдента или  $U$ -критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для оценки взаимосвязи между показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

## Результаты и обсуждение

Диет-индуцированная экспериментальная модель МС у крыс является одним из относительно простых и доступных инструментов, позволяющих изучать взаимодействие различных факторов в механизмах формирования как самих метаболических нарушений, так и их осложнений, а также оценивать влияние различных биологически активных молекул, в том числе газомедиаторов, на патогенез МС [12, 16]. В результате проведенного эксперимента нами установлено, что содержание животных опытной группы в течение 12 недель на ВЖВУД приводило к увеличению массы тела, удельной массы висцеральной жировой ткани, а также к повышению в крови концентрации глюкозы, инсулина, лептина, триацилглицеролов и холестерина. Индекс инсулинорезистентности НОМА-IR у крыс с МС был статистически значимо выше, чем у животных группы контроля (табл. 1).

**Таблица 1/ Table 1**  
Показатели лабораторных и инструментальных исследований, характеризующих формирование метаболического синдрома у крыс / Laboratory and instrumental parameters of metabolic syndrome in rats

Параметр/ Parameter	Группа / Group	
	Контрольная (n = 13)/ Control (n = 13)	Опытная (n = 12)/ Experimental (n = 12)
Масса тела (г)/ Body weight (g)	416,8 ± 25,1	462,5 ± 37,2*
Удельная масса жировой ткани (г)/ Adipose tissue/body weight ratio (g)	2,2 ± 0,6	3,6 ± 0,8*
Глюкоза (ммоль/л)/ Glucose (mmol/l)	5,3 ± 0,4	7,2 ± 0,6*
Инсулин (пмоль/л)/ Insulin (pmol/l)	10,9 ± 3,3	20,1 ± 5,8*
НОМА-IR	2,6 ± 0,4	6,3 ± 0,8*
Лептин (нг/мл)/ Leptin (ng/ml)	2,8 ± 0,4	4,5 ± 0,6*
Триацилглицеролы (ммоль/л)/ Triacylglycerols (mmol/l)	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3*
Холестерол (ммоль/л)/ Cholesterol (mmol/l)	1,9 ± 0,4	2,7 ± 0,5*

Примечание: \* — различия при  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

Note: \*  $p < 0,05$  significance vs. control group.

Уровень АФК в жировой ткани крыс, получавших ВЖВУД, в среднем в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) превышал соответствующее значение в контрольной группе животных, тогда как концентрация GSH у животных опытной группы оказалась ниже в среднем в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) у животных опытной группы (рис. 1). Таким образом, полученные нами данные подтверждают факт формирования у крыс опытной группы характерных для МС метаболических нарушений, как на системном уровне, так и на уровне прооксидантной активности жировой ткани, что, в целом, определяет воспроизведенную модель МС как приемлемую для оценки патогенетической значимости эндогенно продуцируемого  $H_2S$  у экспериментальных животных.



Рис. 1. Уровень АФК и восстановленного глутатиона (GSH) в жировой ткани крыс контрольной и опытной группы. *p* – различия по сравнению с контрольной группой

Fig. 1. Concentration of ROS and reduced glutathione (GSH) in the adipose tissue of control and experimental rats. *p* – significance to control group

Установлено, что на фоне возникающей гипергликемии и инсулинорезистентности при питании крыс высококалорийным рационом концентрация  $H_2S$  в сыворотке крови, жировой ткани и продукция  $H_2S$  адипоцитами экспериментальных животных статистически значимо снижалась по сравнению с животными контрольной группы (табл. 2). В результате статистического анализа установлена отрицательная корреляционная связь между концентрацией  $H_2S$ , а также активностью его наработки в жировой ткани и удельной массой висцерального жира у крыс опытной группы (рис. 2).

Таблица 2 / Table 2

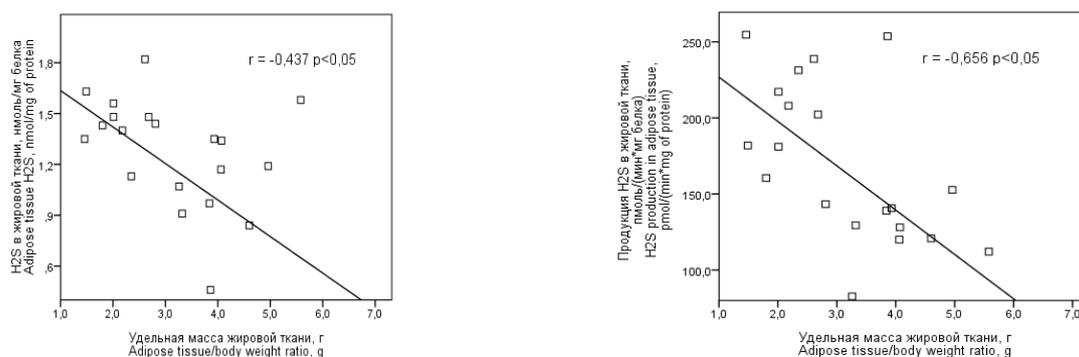
Концентрация  $H_2S$  в сыворотке крови и интенсивность его продукции в жировой ткани у крыс с метаболическим синдромом / Concentration of  $H_2S$  in serum and  $H_2S$  production in adipose tissue of rats with metabolic syndrome

Параметр / Parameter	Группа / Group	
	Контрольная (n = 13) / Control (n = 13)	Опытная (n = 12) / Experimental (n = 12)
$H_2S$ в сыворотке крови (мкмоль/л) / Serum $H_2S$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	19,5 ± 4,6	15,2 ± 1,9*
$H_2S$ в жировой ткани (нмоль/мг белка) / Adipose tissue $H_2S$ (nmol/mg of protein)	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2*
Продукция $H_2S$ в жировой ткани (пмоль/(мин*мг белка)) / $H_2S$ production in adipose tissue (pmol/(min*mg of protein))	213,0 ± 32,1	126,9 ± 19,8*

Примечание: \* – различия при  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

Note: \*  $p < 0,05$  significance vs. control group.

Представленные на сегодняшний день литературные данные о взаимосвязи избыточного накопления жировой ткани и системы биосинтеза  $H_2S$  неоднозначны. Ряд исследователей отмечали как увеличение [17], так и снижение [6, 18, 19] экспрессии ферментов синтеза  $H_2S$  (CBS — цистатионин- $\beta$ -синтаза, CSE — цистатионин- $\gamma$ -лиаза, MST — меркаптопируватсульфотрансфераза) и его продукции в клетках различных органов, в том числе жировой ткани, в зависимости от типа диеты, продолжительности высококалорийного кормления, вида экспериментальных животных. Введение *in vivo* доноров  $H_2S$  или стимуляция эндогенного синтеза  $H_2S$  способствовали накоплению жировой массы у мышей в эксперименте, тогда как истощение продукции  $H_2S$  предотвращало развитие ожирения у животных, вызванного диетой с высоким содержанием жиров [20]. В свою очередь, Ren H. с колл. продемонстрировали, что высококалорийная диета, содержащая концентрат молочного белка, предотвращала ожирение у крыс, что могло быть связано с увеличением уровня  $H_2S$  в плазме крови [21]. Также имеются экспериментальные данные подтверждающие, что продолжительное кормление животных калорийным рационом сопровождается дефицитом эндогенного  $H_2S$  [19]. Авторы клинических исследований сообщали о повышении концентрации  $H_2S$  в выдыхаемом воздухе у детей с ожирением [22] и увеличении концентрации  $H_2S$  в плазме крови у взрослых с морбидным ожирением пропорционально увеличению жировой массы [23].



**Рис. 2.** Зависимость концентрации H<sub>2</sub>S и интенсивности его продукции от массы жировой ткани у крыс контрольной и опытной группы. r – коэффициент корреляции Спирмена, p – различия по сравнению с контрольной группой

**Fig. 2.** Relationship of the concentration of H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>S production with the adipose tissue/body weight ratio in rats of the control and experimental groups; r – Spearman's correlation coefficient; p – significance vs. control group

При анализе взаимосвязи между различными биохимическими показателями и содержанием H<sub>2</sub>S в сыворотке крови и жировой ткани было установлено, что концентрация глюкозы, инсулина и лептина в крови, а также содержание АФК в жировой ткани, отрицательно коррелировали с уровнем H<sub>2</sub>S в сыворотке крови и в жировой ткани. Напротив, высокая концентрация GSH в жировой ткани положительно коррелировала с увеличением уровня H<sub>2</sub>S в сыворотке крови и жировой ткани (табл. 3).

**Таблица 3 / Table 3**

**Взаимосвязи между биохимическими показателями и концентрацией H<sub>2</sub>S в сыворотке крови и жировой ткани крыс с метаболическим синдромом / Correlations between biochemical parameters and H<sub>2</sub>S concentration in blood serum and adipose tissue of rats with metabolic syndrome**

Параметр/ Parameter	H <sub>2</sub> S в сыворотке крови (мкмоль/л)/ Serum H <sub>2</sub> S (μmol/l)	H <sub>2</sub> S в жировой ткáni (нмоль/мг белка)/ Adipose tissue H <sub>2</sub> S (nmol/mg of protein)
Глюкоза (ммоль/л)/Glucose (mmol/l)	-0,55*	-0,62*
Инсулин (пмоль/л)/ Insulin (pmol/l)	-0,42*	-0,32
Лептин (нг/мл)/ Leptin (ng/ml)	-0,56*	-0,36*
АФК жировой ткáni (усл. ед.)/ Adipose tissue ROS (a. u.)	-0,49*	-0,63*
GSH жировой ткáni (нмоль/мг белка)/ Adipose tissue GSH (nmol/mg of protein)	0,45*	0,43*

Примечание: \* – p < 0,05.

Note: \* p < 0,05.

Вопрос о том, каким образом гипергликемия влияет на биосинтез H<sub>2</sub>S остается спорным. Было обнаружено, что высокий уровень глюкозы (20 ммоль/л) подавлял выработку H<sub>2</sub>S в клетках инсулиномы крысы INS-1E. Напротив, глюкоза в концентрации 10 или 20 ммоль/л индуцировала выработку H<sub>2</sub>S в мышечных β-клетках островков MIN6 за счет усиления экспрессии CSE [24]. В экспериментах Wu L. и колл. было показано, что у крыс Zucker с диабетом и ожирением скорость продукции эндогенного H<sub>2</sub>S была выше, чем у крыс без диабета, а ингибирование его продукции способствовало восстановлению уровня глюкозы почти до нормального уровня [25]. Сходные результаты были получены на мышинной модели ожирения с донором GYY4137 [155]. В литературе имеются данные, что как эндогенный, так и экзогенный H<sub>2</sub>S ингибируют секрецию инсулина β-клетками поджелудочной железы [11, 17]. Установлено, что газомедиатор H<sub>2</sub>S вовлечен в регуляцию инсулин-зависимого поглощения глюкозы жировой тканью. При этом сообщается как о стимуляции [26], так и о торможении этого процесса H<sub>2</sub>S за счет его влияния на различные молекулярные мишени, такие как ГЛЮТ-4, PPARγ, PIP3, Akt [10, 21].

Результаты проведенных нами лабораторных тестов свидетельствуют об усилении метаболической активности жировой ткани у животных с МС (гиперлептинемия), а также о сдвиге редокс-

баланса жировой ткани в сторону прооксидантной активности (повышение концентрации АФК и снижение уровня GSH). В литературе представлены данные об участии  $H_2S$  в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток путем посттрансляционной модификаций остатков цистеина (RSH) в персульфиды (RSSH), активации антиоксидантных ферментов, таких как глутатионпероксидаза и супероксиддисмутаза, увеличения в клетках GSH [7, 8] Выявленная нами отрицательная корреляция между концентрацией  $H_2S$ , уровнем лептина и АФК в жировой ткани свидетельствует о вовлечении системы эндогенного биосинтеза  $H_2S$  в патогенез метаболических нарушений, индуцированных ВЖБУД у экспериментальных животных. При этом снижение концентрации  $H_2S$  может рассматриваться как один из факторов системной воспалительной реакции, ассоциированной с ожирением и МС. Тем не менее, широкий спектр и неоднозначность направленности биологических эффектов газомедиатора  $H_2S$  создают предпосылки для дальнейшего изучения его роли в физиологических условиях и при развитии метаболических нарушений.

## Выводы

Несмотря на всестороннее изучение влияния  $H_2S$  на регуляцию различных клеточных функций, сведения о его значимости в развитии и прогрессировании МС продолжают раскрываться и являются во многом противоречивыми. В нашей работе показано, что выраженные нарушения обмена веществ, характеризующие развитие МС у экспериментальных животных (гипергликемия, инсулинемия, лептинемия, прооксидантный редокс-статус), сопровождаются снижением сывороточной концентрации  $H_2S$  и его продукции в жировой ткани. Приняв во внимание вовлеченность системы эндогенного биосинтеза  $H_2S$  в оперирование процессов регуляции гомеостаза, следует подчеркнуть актуальность дальнейшего изучения клеточных и молекулярных механизмов действия газомедиатора  $H_2S$  на клетки-мишени в норме и при метаболической патологии.

## References/Библиографический список

1. Kolluru GK, Shen X, Yuan S, Kevil CG. Gasotransmitter Heterocellular Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(16):936–960. doi:10.1089/ars.2016.6909
2. Cirino G, Szabo C, Papapetropoulos A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol Rev*. 2023;103(1):231–276. doi: 10.1152/physrev.00028.2021
3. Hendriks KD, Maassen H, van Dijk PR, Henning RH, van Goor H, Hillebrands JL. Gasotransmitters in health and disease: a mitochondria-centered view. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;45:87–93. doi: 10.1016/j.coph.2019.07.001
4. Liu YH, Lu M, Hu LF, Wong PT, Webb GD, Bian JS. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(1):141–185. doi: 10.1089/ars.2011.4005
5. Nagpure BV, Bian JS. Brain, Learning, and Memory: Role of  $H_2S$  in Neurodegenerative Diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;230:193–215. doi: 10.1007/978-3-319-18144-8\_10
6. Comas F, Moreno-Navarrete JM. The Impact of  $H_2S$  on Obesity-Associated Metabolic Disturbances. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5):633. doi: 10.3390/antiox10050633
7. Pandey T, Pandey V. Hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) metabolism: Unraveling cellular regulation, disease implications, and therapeutic prospects for precision medicine. *Nitric Oxide*. 2024;144:20–28. doi: 10.1016/j.niox.2024.01.004
8. Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. Chemical Biology of  $H_2S$  Signaling through Persulfidation. *Chem Rev*. 2018;118(3):1253–1337. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00205
9. Wu Z, Barayeu U, Schilling D, Dick TP, Pratt DA. Emergence of (hydro)persulfides as suppressors of lipid peroxidation and ferroptotic cell death. *Curr Opin Chem Biol*. 2023;76:102353. doi: 10.1016/j.cbpa.2023.102353
10. Bełtowski J, Wiórkowski K. Role of Hydrogen Sulfide and Polysulfides in the Regulation of Lipolysis in the Adipose Tissue: Possible Implications for the Pathogenesis of Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1346. doi: 10.3390/ijms23031346
11. Gheibi S., Jeddi S., Kashfi K., Ghasemi A. Effects of Hydrogen Sulfide on Carbohydrate Metabolism in Obese Type 2 Diabetic Rats. *Molecules*. 2019;24(1):190. doi: 10.3390/molecules24010190
12. Birulina JG, Ivanov VV, Buyko EE, Bykov VV, Smagliy LV., Nosarev AV, Petrova IV, Gusakova SV, Popov OS, Vasilev VN. High-fat, high-carbohydrate diet-induced experimental model of metabolic syndrome in rats. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(4):14–20. (In Russian). [Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Быков В.В., Смаглий Л.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Гусакова С.В., Попов О.С., Васильев В.Н. Экспериментальная модель метаболического синдрома у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты // Бюллетень сибирской медицины. 2020. Т. 19, № 4. С. 14–20]. doi: 10.20538/1682-0363-2020-4-14-20
13. Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*. 2005;19(9):1196–1198. doi: 10.1096/fj.04-3583fje
14. Mok YY, Atan MS, Yoke Ping C, Zhong Jing W, Bhatia M, Moochhala S, Moore PK. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br J Pharmacol*. 2004;143(7):881–889. doi: 10.1038/sj.bjpp.0706014

15. Liu L, Zou P, Zheng L, Linarelli LE, Amarell S, Passaro A, Liu D, Cheng Z. Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. *Cell Death Dis*. 2015;6(1): e1586. doi: 10.1038/cddis.2014.553
16. Revenko O, Pavlovskiy Y, Savvytska M, Yashchenko A, Kovalyshyn V, Chelpanova I, Varyvoda O, Zayachkivska O. Hydrogen Sulfide Prevents Mesenteric Adipose Tissue Damage, Endothelial Dysfunction, and Redox Imbalance From High Fructose Diet-Induced Injury in Aged Rats. *Front Pharmacol*. 2021;12:693100. doi: 10.3389/fphar.2021.693100
17. Feng X, Chen Y, Zhao J, Tang C, Jiang Z, Geng B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380(1):153–159. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.059
18. Abramavicius S, Petersen AG, Renaltan NS, Prat-Duran J, Torregrossa R, Stankevicius E, Whiteman M, Simonsen U. GYY4137 and Sodium Hydrogen Sulfide Relaxations Are Inhibited by L-Cysteine and KV7 Channel Blockers in Rat Small Mesenteric Arteries. *Front Pharmacol*. 2021;12:613989. doi: 10.3389/fphar.2021.613989
19. Katsouda A, Szabo C, Papapetropoulos A. Reduced adipose tissue H<sub>2</sub>S in obesity. *Pharmacol Res*. 2018;128:190–199. doi: 10.1016/j.phrs.2017.09.023
20. Yang G, Ju Y, Fu M, Zhang Y, Pei Y, Racine M, Baath S, Merritt TJS, Wang R, Wu L. Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(2):165–176. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.11.008
21. Ren H, Liu TC, Lu Y, Zhang K, Xu Y, Zhou P, Tang X. A comparison study of the influence of milk protein versus whey protein in high-protein diets on adiposity in rats. *Food Funct*. 2021;12(3):1008–1019. doi: 10.1039/d0fo01960g
22. Alkhouri N, Eng K, Cikach F, Patel N, Yan C, Brindle A, Rome E, Hanouneh I, Grove D, Lopez R, Hazen SL, Dweik RA. Breathprints of childhood obesity: changes in volatile organic compounds in obese children compared with lean controls. *Pediatr Obes*. 2015;10(1):23–9. doi: 10.1111/j.2047–6310.2014.221.x
23. Comas F, Latorre J, Ortega F, Arnoriaga Rodríguez M, Lluch A, Sabater M, Rius F, Ribas X, Costas M, Ricart W, Lecube A, Fernández-Real JM, Moreno-Navarrete JM. Morbidly obese subjects show increased serum sulfide in proportion to fat mass. *Int J Obes (Lond)*. 2021;45(2):415–426. doi: 10.1038/s41366–020–00696-z
24. Zhang L, Yang G, Tang G, Wu L, Wang R. Rat pancreatic level of cystathionine  $\gamma$ -lyase is regulated by glucose level via specificity protein 1 (SP1) phosphorylation. *Diabetologia*. 2011;54(10):2615–25. doi: 10.1007/s00125–011–2187–4
25. Wu L, Yang W, Jia X, Yang G, Duridanova D, Cao K, Wang R. Pancreatic islet overproduction of H<sub>2</sub>S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab Invest*. 2009;89(1):59–67. doi: 10.1038/labinvest.2008.109
26. Manna P, Jain SK. Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) activation and H<sub>2</sub>S formation in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2012;287(50):42324–32. doi: 10.1074/jbc.M112.407833

*Ответственный за переписку:* Бирулина Юлия Георгиевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: birulina20@yandex.ru

Бирулина Ю.Г. SPIN 4878-1005; ORCID 0000-0003-1237-9786

Иванов В.В. SPIN 4961-9959; ORCID 0000-0001-9348-4945

Буйко Е.Е. SPIN 6383-3580; ORCID 0000-0002-6714-1938

Воронкова О.В. SPIN 8005-8110; ORCID 0000-0001-9478-3429

Чернышов Н.А. SPIN 7863-9900; ORCID 0000-0002-4008-5606

Гусакова С.В. SPIN 8973-8056; ORCID 0000-0001-5047-8668

*Corresponding author:* Birulina Julia Georgievna — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Division, Siberian State Medical University, Russian Federation, 634050, Tomsk, Moskovsky trakt, 2. E-mail: birulina20@yandex.ru

Birulina J.G. ORCID 0000-0003-1237-9786

Ivanov V.V. ORCID 0000-0001-9348-4945

Buyko E.E. ORCID 0000-0002-6714-1938

Voronkova O.V. ORCID 0000-0001-9478-3429

Chernyshov N.A. ORCID 0000-0002-4008-5606

Gusakova S.V. ORCID 0000-0001-5047-8668



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-340-352

EDN: CRURBE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH

## Система протеолиз/антипротеолиз у условно здоровых мужчин и женщин разного возраста

В.Н. Ющук<sup>1</sup>, Н.С. Чепурнова<sup>1</sup>  , Е.В. Маркелова<sup>1</sup> , М.З. Ермолицкая<sup>2</sup> ,  
А.Ю. Савченко<sup>3</sup> , И.Н. Захаров<sup>3</sup>, К.А. Андрющенко<sup>1</sup>, П.В. Барабаш<sup>1</sup> ,  
Син Ян Цзя<sup>1</sup> , Д.А. Мещерякова<sup>1</sup> , Н.Г. Плехова<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Российская Федерация

<sup>2</sup>Институт автоматизации и процессов управления, г. Владивосток, Российская Федерация

<sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Российская Федерация

 [dr.cns@yandex.ru](mailto:dr.cns@yandex.ru)

**Аннотация.** *Актуальность.* Старение — это естественный биологический процесс ретроградного характера, в ходе которого происходит разбалансирование всех систем, в том числе системы матричных металлопротеиназ (ММП) и тканевых ингибиторов матричных металлопротеиназ (ТИМП). А сосудистое старение связано с функциональными и структурными изменениями преимущественно артериальной сосудистой сети с возрастом. Старение может являться пусковым фактором патологических изменений эндотелия. Молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса дисфункции эндотелия сосудов, включают в том числе повышенную экспрессию и активацию матричных металлопротеиназ, концентрация которых изменяется при старении. Многочисленные исследования сообщают о роли ММП-1,-2,-9,-12 в патогенезе преждевременного старения эндотелия, ими инициируется апоптоз клеток, что способствует повышенной проницаемости, но отсутствуют работы, в которых были проанализированы все возрастные категории как мужчин, так и женщин, неотягощенных соматической патологией. В настоящем исследовании изучаются особенности работы системы протеолиз/антипротеолиз у условно здоровых людей разного возраста и пола. *Материалы и методы.* В рамках пилотного исследования приняло участие 347 условно здоровых людей (226 женщин и 121 мужчин, разделенных по возрасту, согласно классификации ВОЗ), проходивших первый этап диспансеризации в ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр гор. Южно-Сахалинск», у которых проводилось определение уровня ММП и ТИМП в сыворотке крови методом твердофазного ИФА, нг/мл. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0». *Результаты и обсуждение.* Определены изменения системы протеолиз/антипротеолиз как в группе мужчин, так и женщин разного возраста, которые можно охарактеризовать не патологическими, но близкими к таковым. Установлено, что у мужчин в возрасте 60—74 лет зафиксирована дискоординированная работа матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в сторону усиления профиброзирующего эффекта, а у женщин в аналогичной возрастной категории выявлен прямо противоположный компонент — антифиброзирующий. *Выводы.* В настоящем исследовании

© Ющук В.Н., Чепурнова Н.С., Маркелова Е.В., Ермолицкая М.З., Савченко А.Ю., Захаров И.Н., Андрющенко К.А., Барабаш П.В., Цзя Син Ян, Мещерякова Д.А., Плехова Н.Г., 2024



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

было продемонстрировано влияние возраста и гендерной принадлежности на систему матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, кроме того, выделена особая возрастная группа — группа пожилого возраста, которая требует профилактики сосудистой патологии в виду нарушенной системы протеолиз/антипротеолиз.

**Ключевые слова:** старение, матричные металлопротеиназы, ингибиторы матричных металлопротеиназ, эндотелий

**Информация о финансировании.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

**Вклад авторов.** Концепция, дизайн исследования, интерпретация результатов — Маркелова Е.В.; сбор и анализ материалов исследования, введение — Ющук В.Н., Плехова Н.Г.; анализ результатов, подготовка текста рукописи — Чепурнова Н.С.; статистическая обработка данных — Ермолицкая М.З.; формирование базы данных для статистической обработки данных — Савченко А.Ю.; Андрущенко К.А.; обзор литературы — Захаров И.Н., Барабаш П.В., Цзя Син Ян, Мещерякова Д.А. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

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

**Этическое утверждение.** Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 4 от 19.12.2022 г.).

**Благодарности** — неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию.** У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных. Поступила 05.06.2024. Принята 09.07.2024.

**Для цитирования:** Ющук В.Н., Чепурнова Н.С., Маркелова Е.В., Ермолицкая М.З., Савченко А.Ю., Захаров И.Н., Андрущенко К.А., Барабаш П.В., Цзя Син Ян, Мещерякова Д.А., Плехова Н.Г. Система протеолиз/антипротеолиз у условно здоровых мужчин и женщин разного возраста // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 340–352. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-340-352. EDN: CRURBE.

## Proteolysis/antiproteolysis system in apparently healthy men and women of different ages

Vladimir N. Yushchuk<sup>1</sup>, Natalia S. Chepurnova<sup>1</sup>  , Elena V. Markelova<sup>1</sup> ,  
Marina Z. Ermolitskaya<sup>2</sup> , Anastacia Yu. Savchenko<sup>3</sup> , Ivan N. Zakharov<sup>3</sup>,  
Ksenia A. Andrushchenko<sup>1</sup>, Polina V. Barabash<sup>1</sup> , Xing Yang Jia<sup>1</sup> ,  
Daria A. Meshcheryakova<sup>1</sup> , Natalia G. Plekhova<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Automation and Control Processes Vladivostok, Russian Federation

<sup>3</sup>Far Eastern Federal University Vladivostok, Russian Federation

 dr.cns@yandex.ru

**Abstract. Relevance.** Aging is a natural biological process of a retrograde nature, during which there is an imbalance of all systems, including the matrix metalloproteinase (MMP) system and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP).

And vascular aging is associated with functional and structural changes primarily in the arterial vasculature with age. Aging may be a trigger factor for pathological changes in the endothelium. The molecular mechanisms underlying the process of vascular endothelial dysfunction include increased expression and activation of matrix metalloproteinases, the concentration of which changes with aging. Numerous studies report the role of MMP-1, -2, -9, -12 in the pathogenesis of premature aging of the endothelium; they initiate cell apoptosis, which contributes to increased permeability, but there are no studies in which all age categories of both men and women were analyzed, not burdened by somatic pathology. This study examines the features of the proteolysis/antiproteolysis system in apparently healthy people of different ages and genders. *Materials and Methods.* As part of the pilot study, 347 apparently healthy people took part (226 women and 121 men, divided by age, according to the WHO classification), who underwent the first stage of clinical examination at the State Budgetary Institution “Consultative and Diagnostic Center of the Mountains. Yuzhno-Sakhalinsk”, in which the level of MMP and TIMP in the blood serum was determined by solid-phase ELISA, ng/ml. Statistical processing of the research results was carried out using the IBM SPSS Statistics Version 25.0 software package. *Results and Discussion.* Changes in the proteolysis/antiproteolysis system were determined in both a group of men and women of different ages, which can be characterized as not pathological, but close to such. It was found that in men aged 60-74 years, disorganized work of matrix metalloproteinases and their inhibitors was recorded in the direction of enhancing the profibrosing effect, and in women in the same age category, the exact opposite component was identified — anti-fibrosing. *Conclusion.* The current development has demonstrated the influence of age and genetic resources on the system of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, in addition, a special age group has been identified — the elderly group, which requires protection of the vascular system in order to monitor the impaired proteolysis/antiproteolysis system.

**Keywords:** aging, matrix metalloproteinases, matrix metalloproteinase inhibitors, endothelium

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

**Author contributions.** Elena V. Markelova — idea, study design, interpretation of results; Vladimir N. Yushchuk, Natalia G. Plekhova — collection and analysis of research materials, implementation; Natalia S. Chepurnova — analysis of the results, preparation of the manuscript text; Marina Z. Ermolitskaya — statistical data processing; Anastacia Yu. Savchenko — manages databases for statistical data processing; Ksenia A. Andryushchenko, Ivan N. Zakharov, Polina V. Barabash, Jia Xing Yang, Daria A. Meshcheryakova — literature review. All authors made a significant contribution to the development of the concept and manuscript writing, read and approved the final version before publication.

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

**Ethics approval.** The study protocol was approved by the ethics committee of the Pacific State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 4 of December 19, 2022).

**Acknowledgements** — not applicable.

**Consent for publication.** All patients provided informed voluntary consent to participate in the study according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) and personal data processing.

Received 05.06. 2024. Accepted 09.07.2024.

**For citation.** Yushchuk VN, Chepurnova NS, Markelova EV, Ermolitskaya MZ, Savchenko AYU, Zakharov IN, Andryushchenko KA, Barabash PV, Jia Xing Yan, Meshcheryakova DA, Plekhova NG. Proteolysis/antiproteolysis system in apparently healthy men and women of different ages. *RUDN Journal of Medicine.* 2024;28(3):340–352. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-340-352. EDN: CRURBE.

## Введение

Здоровое старение описывает процесс старения, при котором организм сохраняет относительно хорошую функциональность и способность к самостоятельной жизни. В этом случае, старение сопровождается минимальными физиологическими и патологическими изменениями. Здоровое старение

предполагает сохранение физической активности, когнитивных функций, социальной активности и общего благополучия. С другой стороны, патологическое старение характеризуется развитием хронических заболеваний, ухудшением функций органов и систем, а также ограничением способности к самостоятельной жизни. Это может быть

связано с развитием серьезных состояний, таких как деменция, сердечно-сосудистые заболевания, рак, остеопороз и другие возраст-ассоциированные нарушения. Патологическое старение часто сопровождается ухудшением качества жизни и требует медицинского вмешательства и ухода.

Различия между здоровым и патологическим старением не всегда ясны и четко определены. Некоторые люди могут сохранять хорошую функциональность и качество жизни даже в пожилом возрасте, несмотря на физиологические изменения. В то же время, у ряда молодых людей могут возникать ранние признаки патологического старения. Исследования в этой области направлены на более глубокое понимание механизмов старения и разработку стратегий для поддержания здорового старения и предотвращения развития возраст-зависимых патологий.

Понятие сосудистого старения неразрывно связано с функциональными и структурными изменениями преимущественно артериальной сосудистой сети с возрастом. Так, зависящее от возраста ремоделирование эндотелия сосудов и миокарда, помимо прочего, связано с изменениями количества и организации компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ). Молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса дисфункции эндотелия сосудов, включают повышенную экспрессию и активацию матриксных металлопротеиназ, концентрация которых увеличивается при старении [1]. Ремоделирование артерий, опосредованное активацией ММП, является гистопатологическим признаком старения артерий, гипертонии и атеросклероза [1]. Матриксные металлопротеиназы регулируют апоптоз путем расщепления лиганда Fas, что делает клетки нечувствительными к сигналам апоптоза. В то же время, ММП обладают не только антиапоптотическими, но и апоптотическими свойствами. Фактически, процесс старения сосудов связан с изменением в составе ВКМ, структурные белки которого (виментин и винкулин) играют первостепенную роль в архитектуре тканей, обеспечивая структурную поддержку и организацию тканей. Баланс синтеза и деградации ВКМ необходим для нормальной структуры и функционирования эндотелиальной системы. В целом система ММП играет

важную роль в поддержании адекватного состояния сосудистой стенки, что обуславливает актуальность изучения ее характеристик на разных этапах старения с выявлением особенностей у условно-здоровых людей пожилого возраста. Ангиогенез нарушается при старении. Задержка неоваскуляризации частично обусловлена замедлением миграции эндотелиальных клеток. Миграция требует оптимального уровня адгезии к белкам матрикса, и этот процесс опосредуется ММП-1. Авторы предполагают, что недостаточная активность ММП-1 способствует нарушению клеточного движения в старых эндотелиальных клетках микрососудов, однако, нарушения, повышающие активность коллагеназы, повышают их миграционную способность и ангиогенный потенциал [2]. Ключевой ММП является ММП-1, повышенные уровни которой по данным последнего исследования, связаны с риском развития кальцификации артерий (иммуногистохимия и одноклеточные транскриптомы показали, что уровни экспрессии ММП-1 на тканевом и клеточном уровнях были значительно выше в кальцинированных клапанах, чем в некальцинированных регулируемых клапанах) [2].

В аортах человека были обнаружены признаки повышения активности ММП-2 с возрастом [3]. Было показано, что ММП-2 ухудшает функцию эндотелия, снижая выработку NO. В целом, ее повышенный уровень ассоциирован с ростом жесткости сосудов у лиц молодого возраста, особенно в присутствии гипертонии [4]. ММП-9 представляет собой желатиназу с очень низкой каталитической способностью для структурных белков, которая участвует в протеолитической активации других важных биологически активных молекул, таких как TGF- $\beta$ , и других «профибротических» белков [5]. Было показано, что ММП-9 могут служить возраст-зависимым регулятором старения сердца посредством изменения отложения коллагена в ВКМ [6]. До сих пор отсутствуют доказательства связи уровней ММП-9 со здоровым старением.

Вклад ММП в старение сосудов был дополнительно подтвержден наблюдениями за влиянием на ингибирование ММП. Было показано, что ТИМП, включающие четыре молекулы (ТИМП-1, -2, -3, -4),

которые обратимо ингибируют протеолитическую активность функциональных ММР. Аналогичные эффекты были продемонстрированы для ТИМП-2, главным образом через механизмы миграции ГМК и апоптоза [7]. Кроме того, ТИМП-1, обладает протективными свойствами в отношении разрыва аневризмы аорты в связи с предотвращением разрушения эластина.

Целью настоящего исследования было охарактеризовать влияние старения на основные белки ВМК у условно здоровых мужчин и женщин разного возраста.

### Материалы и методы

В исследование включены 347 условно здоровых добровольцев, проходивших первый этап диспансеризации в ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр гор. Южно-Сахалинск», из них 226 женщин и 121 мужчин, разделенных по возрасту, согласно классификации ВОЗ. Исследование проведено в рамках темы НИР, запланированной и утвержденной на заседании Ученого совета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 27.06.2022 г., протокол № 12/21-22. Номер государственной регистрации 122071500006-6 от 15.07.2022 г. Исследование проводилось в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных исследований с участием человека в качестве субъекта» с поправками 2013 г., правилами надлежащей клинической практики в РФ (приказ Министерства здравоохранения РФ № 200н от 01.04.2016) и статей 20,22,23 Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ (в ред. От 26.05.2021). Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 4 от 19.12.2022 г.). Всех добровольцев, включенных в исследование, информировали о дизайне исследования и об

этапах его проведения, что отражено в протоколе добровольного информированного согласия. От каждого человека было получено добровольное информированное согласие на обследование, данные анамнеза и результаты обследования вносились в разработанную индивидуальную карту.

Определение содержания металлопротеиназ 1, 2, 9 типов (ММП-1, ММП-2, ММП-9) и их тканевых ингибиторов 1 и 2 типов (ТИМП-1 и ТИМП-2), в сыворотке крови проводили из локтевой вены утром натощак, методом твердофазного ИФА с помощью специфических реактивов фирмы «R&D Diagnostics Inc.» (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, согласно прилагаемых инструкций. Расчеты количества металлопротеиназ и их ингибиторов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в нг/мл. Исследования проводились в Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заведующий лабораторией доктор биологических наук, доцент Плехова Н.Г.).

При проведении статистической обработки материалов исследования руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов и рекомендациями [8]. Учитывая численность исследуемых групп, оценка нормальности распределения количественных признаков проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Учитывая распределение данных отличное от нормального, результаты исследования представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3). Ранговый анализ вариаций по Краскелу – Уоллису (H) выполняли для сравнения трех и более независимых групп по одному количественному признаку. Затем, при наличии статистически значимых различий проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна – Уитни (U) с поправкой Бонферрони [9]. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных исследования проводилось

при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йейтса, позволяющего оценить значимость между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Во всех случаях  $p < 0,05$  считали статистически значимым [8]. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США).

### Результаты и обсуждение

При оценке значений ММП-1 у условно здоровых мужчин не было выявлено значимых различий в зависимости от возраста (табл.). Самые высокие значения ММП-2 зафиксированы в группе пожилого возраста, в то время как в группе молодого возраста определены самые низкие ее показатели ( $p_{1,3} = 0,01095$ ). Достоверной разницы значений ММП-2 в группах среднего и старческого возраста не выявлено, при этом они были выше показателей

мужчин в возрасте 18–45 лет и ниже — 60–74 лет. Анализ уровня ММП-9 определил тенденцию к снижению ее уровня согласно повышению возраста, однако в группе пожилого возраста зафиксировано резкое ее снижение, а затем в группе старческого возраста — повышение в 1,3 раза (табл.). Уровень ТИМП-1 в группах мужчин молодого и пожилого возраста не отличался, но в группе среднего возраста он был самым низким, а в группе старческого возраста — самым высоким. Значения ТИМП-2 были выше в группе мужчин в возрасте 60–74 лет.

Распределение протеолитической активности у условно здоровых женщин в зависимости от возраста имело другую картину: ММП-1 и ММП-2 не отличались в группах, распределенных по возрастным категориям. Достоверно более низкие значения ММП-9 зафиксированы в группе женщин среднего и пожилого возраста (табл.). Уровень ТИМП-1 был выше в группе старческого возраста, в категории от 18 до 74 лет различий по уровню изучаемого показателя не выявлено. Содержание ТИМП-2 в сыворотке крови были ниже в группе женщин пожилого возраста, при этом между остальными группами различий по возрасту не выявлено.

**Уровни матриксных металлопротеиназ и тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ в сыворотке венозной крови у условно здоровых мужчин и женщин разного возраста (медианные значения и соответствующие доверительные интервалы [Q1, Q3]) / Levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in venous blood serum in apparently healthy men and women of different ages (median values and corresponding confidence intervals [Q1, Q3])**

Показатель, нг/мл/ Index, ng/ml	Условно здоровые мужчины/ Conditionally healthy men, n = 121			
	1	2	3	4
	18-44 лет/ 18-44 years old n = 29	45-59 лет/ 45-59 years old n = 25	60-74 лет/ 60-74 years old n = 47	75 лет и более / years old or more n = 20
ММП-1/ MMP-1	0,66 (0,583-0,73) $p_{II} = 0,0023$	0,645 (0,605-0,675) $p_{I,2} = 0,7015$ $p_{II} = 0,5432$	0,625 (0,568-0,693) $p_{I,3} = 0,4826$ $p_{I,2,3} = 0,7861$ $p_{II} = 0,3468$	0,685 (0,665-0,818) $p_{I,4} = 0,2565$ $p_{I,2,4} = 0,2571$ $p_{I,3,4} = 0,1704$ $p_{II} = 0,01489$
ММП-2/ MMP-2	113,9 (102,3-147,3) $p_{II} = 0,0032$	126,1 (116,7-133,7) $p_{I,2} = 0,9118$ $p_{II} = 0,0543$	139,6 (78,31-169,2) $p_{I,2,3} = 0,659$ $p_{I,1,3} = 0,01095$ $p_{II} = 0,6473$	127,3 (108,6-135,5) $p_{I,4} = 0,8907$ $p_{I,2,4} = 1$ $p_{I,3,4} = 0,4783$ $p_{II} = 0,04567$

Окончание таблицы/End of the table

Показатель, нг/мл/ Index, ng/ml	Условно здоровые мужчины/ Conditionally healthy men, n = 121			
	1	2	3	4
	18-44 лет/ 18-44 years old n = 29	45-59 лет/ 45-59 years old n = 25	60-74 лет/ 60-74 years old n = 47	75 лет и более / years old or more n = 20
ММП-9/ ММП-9	105,3 (55,68-137,6) p <sub>II</sub> = 0,0165	91,48 (59,88-125,4) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,3836 p <sub>II</sub> = 0,01546	58,58 (47,5-137,8) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,01304 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,02857 p <sub>II</sub> = 0,2376	88,68 (57,11-103,7) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,5761 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,6485 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,01796 p <sub>II</sub> = 0,01569
ТИМП-1/ ТИМП-1	102,1 (45,35-188,4) p <sub>II</sub> = 0,0123	52 (25,5-150,3) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,01143 p <sub>II</sub> = 0,0501	112,9 (90,1-183,9) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,6742 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,04615 p <sub>II</sub> = 0,03657	164,6 (80,95-201,8) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,0501 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,0173 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,0574 p <sub>II</sub> = 0,00032
ТИМП-2/ ТИМП-2	46,86 (45,99-54,63) p <sub>II</sub> = 0,05002	48,32 (47,32-49,60) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,9554 p <sub>II</sub> = 0,0436	54,51 (51,05-59,17) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,0411 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,04184 p <sub>II</sub> = 0,0543	46,37 (43,74-48,65) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,2701 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,6667 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,01875 p <sub>II</sub> = 0,04491
Показатель, тнг/мл/ Index, ng/ml	Условно здоровые женщины/ Conditionally healthy women, n = 226			
	1	2	3	4
	18-44 лет/ 18-44 years old n = 29	45-59 лет/ 45-59 years old n = 25	60-74 лет/ 60-74 years old n = 47	75 лет и более / years old or more n = 20
ММП-1/ ММП-1	0,47 (0,41-0,57)	0,56 (0,44-0,59) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,2874	0,51 (0,4-0,6) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,9259 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,3581	0,47 (0,44-0,67) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,6233 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,9454 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,4333
ММП-2/ ММП-2	144,8 (123,3-165)	150,3 (130,3-166,2) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,4815	150,2 (132,1-164,2) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,8533 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,7137	154,6 (120,6-164,2) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,9188 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,7737 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,8548
ММП-9/ ММП-9	60,13 (40,16-100,70)	51,64 (30,68-118,1) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,4773	45,94 (35,9-71,36) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,01592 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,5074	50,68 (47,26-84,36) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,7662 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,9175 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,4097
ТИМП-1/ ТИМП-1	81,05 (45,92-144,8)	74,3 (40,9-150,1) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,9373	71,25 (37,67-126,9) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,5141 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,4174	98,75 (42,65-164,8) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,06494 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,03704 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,01732
ТИМП-2/ ТИМП-2	89,34 (69,88-92,06)	82,18 (62,45-89,07) p <sub>I</sub> 1,2 = 0,07946	74,24 (63,67-89,74) p <sub>I</sub> 1,3 = 0,0001743 p <sub>I</sub> 2,3 = 0,847	76,32 (66,02-87,24) p <sub>I</sub> 1,4 = 0,07284 p <sub>I</sub> 2,4 = 0,1649 p <sub>I</sub> 3,4 = 0,8721

Примечание: p<sub>I</sub> 2, 3, 4 – уровень значимости, полученный при проверке различий между значениями показателя внутри групп в зависимости от возраста (критерий Манна – Уитни); p<sub>II</sub> – уровень значимости, полученный при проверке различий между значениями показателя внутри групп в зависимости от пола. ММП – матричные металлопротеиназы, ТИМП – тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ.

Note: p<sub>I</sub> 2, 3, 4 – level of significance obtained by testing differences between indicator values within groups depending on age (Mann – Whitney test); p<sub>II</sub> – level of significance obtained by testing differences between indicator values within groups depending on gender. MMP – matrix metalloproteinases, TIMP – tissue inhibitors of matrix metalloproteinases.

Кроме того, различия были зафиксированы при гендерном распределении. Так, уровень ММП-1 у мужчин возраста 18–44 года был в 1,5 раза выше уровня ММП-1 в женской группе 18–44 года (таблица,  $p = 0,0023$ ). В возрасте 45–74 года ММП-1 в зависимости от пола не различались. В старческом возрасте у условно здоровых мужчин ММП-1 превышали значения женщин, сопоставимых по возрасту, ( $p = 0,01489$ ). По уровню ММП-2 зафиксированы различия только в возрасте 18–44 года, где ее значения были выше в женской группе исследуемых ( $p = 0,0032$ ).

Значения ММП-9 в возрасте 18–44 года у мужчин превышали одноименные значения женщин в практически в 2 раза, в группе 45–59 лет — в 1,7 раз, а в группе 75 лет и старше — в 1,6 раз. Необходимо отметить, что уровень ТИМП-1 во всех возрастных группах мужчин превышал одноименные значения у женщин, но в группе среднего возраста ТИМП-1 был выше именно в женской группе. А значения ТИМП-2 в целом в группе мужчин были достоверно ниже значений женской группы.

Если рассмотреть исследования изменений активности металлопротеиназ при старении, можно констатировать неоднозначность результатов влияния возраста и пола, полученных разными авторами, на систему ММП.

Так, продукция ММП-1 значительно увеличивается у женщин пожилого возраста (60–74 года): значения ММП-1 у женщин в возрасте от 30 до 59 лет существенно не менялись, однако в возрасте 60–74 лет её уровень был в 3 раза выше ( $p < 0,01$ ) [10]. Уровни ММП-2, ММП-8 и ММП-9 не изменялись в зависимости от возраста по результатам исследований Кныш С.В. с соавт. (2019), однако согласно исследованию D. Dirk Bonnema с соавт. (2007) значения ММП-2 увеличивались (с  $1188 \pm 99$  нг/мл до  $1507 \pm 76$  нг/мл) ( $p < 0,05$ ), а уровень ММП-9, напротив, уменьшался (с  $29 \pm 7$  нг/мл до  $8 \pm 2$  нг/мл) ( $p < 0,05$ ) [11].

Результаты изменений значений ТИМП-1 и ТИМП-2 с возрастом значительно разнятся. Согласно одним исследованиям показатели ТИМП-1 значительно уменьшаются: в группе 30–44 — самые

высокие результаты (в 2 раза выше группы 45–59 лет и в 4 раза выше группы 60–74 года); ТИМП-2 также уменьшаются с возрастом (в группе 30–44 лет в 2 раза выше, чем в группе 44–59 лет, однако значения группы 60–74 года переменны, и четкие различия есть только с группой 30–44 года) [10]. Тогда как D. Dirk Bonnema с соавт. (2007), напротив, показали, что ТИМП-1 и ТИМП-2 увеличиваются с возрастом: с  $728 \pm 46$  нг/мл до  $1093 \pm 73$  нг/мл у ТИМП-1 и с  $34 \pm 5$  нг/мл до  $53 \pm 6$  нг/мл у ТИМП-2 ( $p < 0,05$ ) [11].

Подробное исследование состояния ММП-2 в зависимости от возраста было проведено P. Sansoni с соавт. (2020) у проживающих на Сицилии [12]. В ходе работы был проведен статистический анализ показателей уровня металлопротеиназ у людей, разделенных на группы (менее 40, 40–64, 65–89, 90–94, 95 и более лет: 1–5 группы соответственно). Было выявлено, что активность ММП-2 в сыворотке крови может положительно влиять на продление жизни. Было обнаружено, что уровень ММП-2 увеличивается у долгоживущих пациентов по сравнению с более молодыми, при этом, при распределении когорт в зависимости от пола — явное увеличение активности ММП-2 с возрастом наблюдалось у мужчин, но не у женщин. Причины данного различия не выявлены, но выдвинуты гипотезы, по которым такая зависимость вызвана либо изменением гормонального статуса женщин при старении, либо тем, что у мужчин, определенных в группу исследования, были лучшие показатели здоровья.

В целом, при анализе системы ММП/ТИМП в настоящем исследовании нами определены изменения системы протеолиз/антипротеолиз как в группе мужчин, так и женщин. У мужчин именно в возрасте 60–74 года зафиксирована дискоординированная работа матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сторону усиления профиброзирующего эффекта. Тогда как в группе женщин в этой возрастной категории выявлен прямо противоположный компонент — антифиброзирующий, с преобладанием работы матриксных металлопротеиназ. Исходя из этого, именно группа пожилого возраста является группой риска развития сосудистых изменений

и рассматривается нами как начальная стадия сердечно-сосудистых патологий, что предопределяется еще в более молодом возрасте.

Как известно, внеклеточный матрикс обеспечивает структурную основу, необходимую для функциональных свойств стенок сосудов. Внеклеточный матрикс — это динамическая структура, состоящая из набора белков, которые выполняют различные функции в процессе развития и гомеостаза тканей благодаря своим уникальным биохимическим и биомеханическим свойствам. Многочисленные физиологические и патологические состояния вовлечены в модификацию ВКМ, изменяя «нормальный» ансамбль белков, которые соответствуют этому матриксу, также известному как «матрисома» [13]. В физиологическом контексте ядро матрисомы в основном состоит из волокнистых белков (коллагеновых и эластиновых волокон), гликопротеинов (фибронектинов и ламининов) и протеогликанов. Коллагены образуют одно из основных семейств белков ВКМ, тем самым играя критическую роль в поддержании структуры большинства тканей. В отличие от коллагена, зрелый эластин — нерастворимый белок, который обеспечивает упругость и эластичность тканей, таких как артерии, легкие, связки и кожа, — обладает превосходной метаболической стабильностью с течением времени, в отличие от других белков [13]. Однако эластин также подвергается различным изменениям во время старения, и эластоз — накопление частично разрушенных эластиновых волокон в ВКМ — является отличительным признаком старения сосудов [14]. Таким образом, низкий оборот белков ВКМ приводит к накоплению повреждений во время старения, являясь ключевым фактором запуска и прогрессирования патологического старения, тем самым влияя на биологические функции в стареющих тканях [14]. Трехмерная организация молекул внеклеточного матрикса — эластина, коллагенов, протеогликанов и структурных гликопротеинов, синтезируемых во время внутриутробного развития, — оптимальна для выполнения этих функций. В неповрежденных артериях и венах конститутивно экспрессируются некоторые протеазы, но благодаря контролю их

активации и/или ингибированию ингибиторами эти протеазы обладают очень низкой активностью, а оборачиваемость эластичных и коллагеновых волокон низка [15]. Во время старения и при возникновении сосудистых патологий баланс между протеазами и их ингибиторами временно нарушается из-за индукции экспрессии генов матриксных металлопротеиназ, активации зимогенов или секреции ферментов воспалительными клетками. Гладкомышечные клетки, наиболее многочисленные клетки в стенках сосудов, обладают высокой способностью реагировать на повреждение благодаря своей способности синтезировать молекулы внеклеточного матрикса и ингибиторы протеаз [16]. Однако трехмерная организация вновь синтезированного внеклеточного матрикса никогда не бывает функционально оптимальной. При некоторых других патологиях — аневризме — повреждение снижает способность гладкомышечных клеток реагировать, и количество внеклеточного матрикса уменьшается.

Известно, что полностью здоровых людей не бывает, в человеческом организме процессы старения всегда будут сопровождаться отклонениями от нормы в работе каких-либо систем. Так, нами были представлены доказательства наличия таких отклонений у условно здоровых людей, результаты которых схожи с показателями артериальной гипертензии.

Многие исследования связывают возрастное уплотнение крупных эластичных артерий с повышенным уровнем ММП-2. В данных исследованиях было доказано, что повышение активности ММП-2 приводит к ремоделированию сосудов и артериальной ригидности. Чтобы способствовать хроническому ремоделированию сосудов при гипертензии, ММП-2 может разрушать коллаген типа IV, компонент базальной мембраны гладкомышечных клеток, который облегчает миграцию и пролиферацию клеток, что приводит к сохранению повышенного АД, создавая тем самым порочный круг.

На данный момент существует обширная база исследований, которые освещают важную роль активности ММП не только в физиологических процессах, таких как ангиогенез, эмбриональное

развитие, регенерация тканей, но также предоставляют данные об изменении их активности при старении органов и тканей, а также гипертонической болезни. Изучение активности ММП, их влияние на процессы старения в органах и тканях является перспективным направлением, поскольку использование этих данных в превентивной медицине. Увеличение активности ММП в организме человека на данный момент может использоваться в профилактической медицине как диагностический маркер для предупреждения развития различного рода сердечно-сосудистых катастроф, в том числе гипертонии и гипертонического криза.

Однако, стоит упомянуть, что с ростом количества публикаций по данным темам, начинают появляться исследования, согласно которым увеличение активности ММП могут, наоборот, влиять на увеличение продолжительности жизни людей, а также некоторые из ММП могут называться антиатеросклеротическими факторами. Тем не менее, для того, чтобы получить развернутый ответ на причинность полученных данных, нужно провести больше исследований для установления закономерностей их возникновения: стоит выяснить, являются ли они толчком к изучению активности ММП с другой позиции и пересмотру прошлых данных, или они все же обусловлены генетическими особенностями группы людей, участвующих в исследовании.

Старение подразумевает под собой платформу физиологических изменений, на которой параллельно могут размещаться возраст-ассоциированные повреждения. Однако влияние старения на компоненты внеклеточного матрикса сердца у лиц, не страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, изучено не до конца. Мы стремились охарактеризовать влияние старения на систему протеолиз/антипротеолиз мужчин и женщин. Предпринимались попытки оценки влияния старения на основные белки ВКМ сердечной мышцы у мужчин и женщин. Так, E. Dworatzek et al. (2016) продемонстрировали зависимость от возраста и пола регуляцию коллагена I и III типов (взаимодействие  $p < 0,05$ ), VI типа (взаимодействие  $p = 0,01$ ), тканевого ингибитора металлопротеиназы 3 (взаимодействие

$p < 0,05$ ) [17]. Авторы описали, что уровни этих белков у молодых людей были ниже у женщин, чем у мужчин, в то время как у пожилых людей они были выше у женщин, чем у мужчин. Это опосредованное возрастом ремоделирование ВКМ миокарда может играть ключевую роль в ограниченной способности стареющего сердца адекватно адаптироваться к измененной рабочей нагрузке и реагировать на повреждение тканей. Нарушение регуляции синтеза и деградации коллагена способствует отложению интерстициального и периваскулярного коллагена, что доказывает участие в процессе развития. Повышенная активность ММП способствует воспалению эндотелия (апоптоз/некроз, тромбоз и дисфункция). ММП-1 усиливает старение эндотелия посредством активации p53. ММП-2 расщепляет межклеточные соединения и клеточный матрикс, включая VE-кадгерин и  $\beta$ - и  $\gamma$ -катенин, которые инициируют апоптоз или некроз ВМК, опосредованный активированной каспазой 3, способствуя повышению проницаемости [18]. Активированная локальная ММП-2 также способствует агрегации тромбоцитов и образованию тромбов, в то время как потеря ММП-2 в тромбоцитах уменьшает связанный с повреждением артерий тромбоз, что позволяет предположить, что ММП-2 является звеном патогенеза тромбообразования. Кроме того, воздействие ММП-2 на клетки эндотелия снижает выработку оксида азота из-за деградации белка теплового шока и кофактора эндотелиальной азотсинтазы, и нарушает процесс вазодилатации. Ассоциированная с ММП инвазия и пролиферация недифференцированных компонентов ВМК является молекулярной основой патологического старения. Активированная внутриклеточно ММП-2 расщепляет кальпонин-1, маркер дифференцировки, переводя фенотип этих клеток в де-дифференцированное состояние [17]. Активированные внеклеточно ММП расщепляют коллаген и базальные мембраны, выводя эндотелиальные клетки из состояния покоя в состояние разрешающей пролиферации. Активация ММП-1/-2/-9 способствует экспрессии растворимого фактора роста тромбоцитов — мощного митогена для эндотелиальных клеток. Примечательно, что ММП-8 непосредственно

способствует пролиферации эндотелия. ММП-2 расщепляет базальную мембрану, а эластиновые волокна эффективно усваивают активные ММП-2/-9, что приводит высвобождению фибриллина-1 через TGF-1-зависимый путь, усиливая повышенную выработку эндотелием сосудов коллагена I, II и III, и фибронектин. Повышенная инфильтрация моноцитов/макрофагов и тучных клеток в адвентицию, сопровождающаяся активацией ММП-2/-9, способствует разрушению артериальной стенки. ММП-2 способна разрушать ряд белков миофиламентов, связанных с сократительной способностью, что вызывает снижение чувствительности миофиламентов к  $Ca^{2+}$  с последующей сократительной дисфункцией, как это наблюдается в сценарии ишемии–реперфузии [18]. ММП-2, в частности, находится в изобилии и активно удерживается в цитоплазме [19], участвует в повреждении и восстановлении миокарда, также может непосредственно нарушать функцию желудочков при отсутствии повреждения и участвует в нехарактерных физиологических функциях поперечнополосатой мышцы, возможно, в поддержании протеостаза саркомеров [19].

Значимость протеолиза эластина, опосредуемого эластазами, при старении сосудов хорошо известна. Эластазы, которые включают несколько представителей серин-, цистеин- и металлопротеиназ, таких как эластаза нейтрофилов, катепсины G, L, S и K или ММП-2, -7 и -9, расщепляют нерастворимый и растворимый эластин и приводят к изменению толщины, эластичности и жесткости стенки сосудов кровообращения с возрастом [20]. Более того, деградация эластина также приводит к образованию производных пептидов эластина, также известных как эластокины, которые участвуют в регуляции ряда физиологических процессов, таких как миграция клеток, выработка протеаз и апоптоз [13]. В совокупности эти изменения могут способствовать развитию и прогрессированию различных патогенных состояний, которые еще больше нарушают функцию сосудистой сети.

Уровни ТИМП-1 и, следовательно, ингибирование активности ММП могут по-разному влиять на рост атеросклеротических бляшек в зависимости от

сосудистого русла и стадии атеросклероза, причем влияние на состав бляшки более значимо, чем размер бляшки при прогрессирующих бляшках [17]. Можно предположить, что ТИМП-1 защищает от развития коронарного атеросклероза, одновременно усугубляя фиброз сердца и влияя на процесс ремоделирования. G. Kremastiotis et al. (2021) не установили связи между сверхэкспрессией ТИМП-2 и плотностью сердечного коллагена [17]. Ими ранее было показано, что потеря ТИМП-2 ускоряет неблагоприятное ремоделирование после инфаркта миокарда, о чем свидетельствует снижение содержания коллагена наряду с увеличением размера инфаркта, что объясняется усилением воспаления и связанной с ним экспрессией и активностью ММП. ТИМП-2, также, как и ММП-2, ММП-9 экспрессируется в постмитотических нейронах и способствует росту нейритов и дифференцировке клеток в результате остановки клеточного цикла за счет увеличения выработка ингибитора циклинзависимой киназы p21CIP и снижение экспрессии циклинов B и D. Исследования показывают, что отсутствие ТИМП-1 приводит к значительному ухудшению формирования ассоциативных связей и запоминания [21]. Этот эффект, вероятно, опосредован влиянием на развитие нейронов, а не прямым действием ТИМП-1 на память.

## Выводы

В настоящее время имеется множество свидетельств, подтверждающих идею о том, что стареющие ткани способны приводить к физиологическому и функциональному истощению здоровых тканей, что могло бы объяснить координацию между различными органами и системами во время старения. Разработка моделей парабиоза подтвердила, что на старение могут влиять системные факторы. Эти секретлируемые факторы, которые могут модулировать процесс старения паракринным и аутокринным образом. Хотя на сегодняшний день идентифицировано лишь несколько из этих факторов и путей, многие исследования указывают на стареющие клетки как на один из основных источников, ответственных за функциональное нарушение тканей, и, следовательно,

но, определяются как движущая сила старения и возрастных заболеваний. Система металлопротеиназ в зависимости от возраста однозначно изменяется. Однако по данным результатов различных исследований, нельзя с точностью сказать, в каком объеме и в какую сторону меняется система изучаемого объекта. Наличие противоречивых и немногочисленных данных не вызывает сомнений в актуальности дальнейших исследований системы металлопротеиназ у групп различного возраста. В настоящем исследовании было продемонстрировано влияние возраста и гендерной принадлежности на систему матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, кроме того, выделена особая возрастная группа — группа пожилого возраста, которая требует профилактики сосудистой патологии в виду нарушенной системы протеолиз/антипротеолиз.

## References/Библиографический список

1. Stakhneva EM, Kashtanova EV, Polonskaya Ya V. Mechanisms of vascular aging. *Bulleten' sibirskoj mediciny*. 2022;21(2):186-194. [Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Шрамко В.С., Рагино Ю.И. Механизмы сосудистого старения / Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В. [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. 2022. Т. 21. № 2. С. 186-194.] (In Russian).
2. Iannarelli NJ, MacNeil AJ, Dempster KS, Wade TJ [et al.] Serum MMP-3 and its association with central arterial stiffness among young adults is moderated by smoking and BMI. *Physiology Report*. 2021;9(11): e14920.
3. Simões G, Pereira T, Caseiro A. Matrix metalloproteinases in vascular pathology. *Microvascular Research*. 2022;143:104398.
4. Stabouli S, Kotsis V, Maliachova O, Printza N. Matrix metalloproteinase –2, –9 and arterial stiffness in children and adolescents: The role of chronic kidney disease, diabetes, and hypertension. *International Journal of Cardiology Hypertension*. 2020;4:100025.
5. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology*. 2013;28:391-403.
6. Knox A. Arterial Aging, Metalloproteinase Regulation, and the Potential of Resistance Exercise. *Current Cardiology Reviews*. 2018;14(4):227-232.
7. Wang X, Khalil RA. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Advances in Pharmacology*. 2018;8:241-330.
8. Grzhibovsky AM, Ungureanu TN. Analysis of biomedical data using the statistical software package SPSS: textbook. Arkhangelsk: Publishing House of the Northern State Medical University, 2017. — 293 p. (In Russian). [Гржибовский А.М., Унгуриану Т.Н. Анализ биомедицинских данных с использованием пакета статистических программ SPSS: учебное пособие / Архангельск: Изд-во Северного государственного медицинского университета, 2017. 293 с.]
9. Mudrov VA. Algorithms for statistical analysis of qualitative features in biomedical research using the SPSS software package. *JeNI Zabajkal'skij medicinskij vestnik*. 2020;1:151-163. (In Russian). [Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. ЭНИ Забайкальский медицинский вестник. 2020. № 1. С. 151-163.]
10. Knysh SV, Chepurnova NS, Birko ON, Baibarina EV, Kudinov AA, Pirozhinskaya AA. Study of indicators of the system of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the blood serum of patients of different age groups. *Rossiiskij allergologicheskij zhurnal*. 2019;16(1):72-74. (In Russian). [Кныш С.В. Чепурнова Н.С., Бирко О.Н., Байбарина Е.В., Кудинов А.А., Пирожинская А.А. Исследование показателей системы металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в сыворотке крови пациентов разных возрастных групп // Российский аллергологический журнал. 2019. Т. 16. № 1S. С. 72-74.]
11. Bonnema DD, Webb CS, Pennington WR, Stroud RE, Leonardi AE, Clark LL, McClure CD, Finklea L, Spinale FG, Zile MR. Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). *Journal of Cardiac Failure*. 2007;13(7):530-540. doi: 10.1016/j.cardfail.2007.04.010
12. Cancemi P, Aiello A, Accardi G, Caldarella R, Candore G, Caruso C, Ciccio M, Cristaldi L, Di Gaudio F, Siino V, Vasto S. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in Ageing and Longevity: Focus on Sicilian Long-Living Individuals (LLIs). *Mediators Inflammation*. 2020; P:1-11. doi: 10.1155/2020/8635158
13. Freitas-Rodríguez S, Folgueras AR, López-Otín C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Acta Molecular Cell Research*. 2017;1864:2015-2025. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.007
14. Xiao P, Zhang Y, Zeng Y. Impaired angiogenesis in ageing: the central role of the extracellular matrix. *J. Transl. Med*. 2023;21:457. doi: 10.1186/s12967-023-04315-z
15. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57(5-6):195-202. doi:10.1016/s0753-3322(03)00065-9
16. Dworatzek E, Baczek I, Kararigas G. Effects of aging on cardiac extracellular matrix in men and women. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(1):84-91. doi: 10.1002/prca.201500031
17. Kremastiotis G, Handa I, Jackson C, George S, Johnson J. Disparate effects of MMP and TIMP modulation on coronary atherosclerosis and associated myocardial fibrosis. *Sci Rep*. 2021;30.11(1):23081. doi: 10.1038/s41598-021-02508-4
18. Cabral-Pacheco GA., Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;20;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739
19. Kolomeychuk SN, Korneva VA, Ilyukha VV, Kuznetsova AS, Kuznetsova T Yu. Study of polymorphic variants of the matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene as a marker of the risk of developing arterial hypertension and coronary heart disease in the population of the Republic of Karelia. *Journal of Biomedical Technologies*. 2014;2:10-16.

(In Russian). doi: 10.15393/j6.art.2014.3202 20 [Коломейчук С.Н., Корнева В.А., Илюха В.В., Кузнецова А.С., Кузнецова Т.Ю. Исследование полиморфных вариантов гена матричной металлопротеиназы 3 (ММП-3) в качестве маркера риска развития артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у населения Республики Карелия // Journal of Biomedical Technologies. 2014. № 2. С. 10-16].

20. Britton R, Wasley T, Harish R, Holz C, Hall J, Yee DC, Melton Witt J, Booth EA, Braithwaite S, Czirr E, Kerrisk CM. Noncanonical Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2 (TIMP-2) Improves Cognition and Synapse Density in Aging. *eNeuro*. 2023;10(6):1-23.2023. doi: 10.1523/ENEURO.0031-23.2023

21. Litvinova MS, Khaisheva LA, Kuts EI. Relationship between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor with parameters of 24-hour blood pressure monitoring in patients with resistant arterial hypertension. *Rossiiskij kardiologicheskij zhurnal*. 2022;6:131-133. (In Russian). [Литвинова М.С., Хаишева Л.А., Куц Е.И. Связь матричной металлопротеиназы-9 и ее ингибитора с параметрами суточного мониторирования артериального давления у больных резистентной артериальной гипертензией // Российский кардиологический журнал. 2022. № 6. С. 131-133].

*Ответственный за переписку:* Чепурнова Наталья Сергеевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Российская Федерация, 690002, г. Владивосток, проспект Острякова, 4. E-mail: dr.cns@yandex.ru

Ющук В.Н. SPIN 7096-1850

Чепурнова Н.С. SPIN 6726-8523; ORCID 0000-0001-6642-1332

Маркелова Е.В. SPIN 3661-5026; ORCID 0000-0001-5846-851X

Ермолицкая М.З. SPIN 9197-4028; ORCID 0000-0003-2588-102X

Андрющенко К.А. ORCID 009-005-0942-8075

Барабаш П.В. ORCID 0009-0006-5548-3451

Цзя Син Ян ORCID 0009-0008-5962-2118

Мещерякова Д.А. ORCID 0009-0003-6410-8248

Плехова Н.Г. SPIN 2685-9578; ORCID 0000-0002-8701-7213

*Corresponding author:* Chepurnova Nataia Sergeevna, PhD, MD, Assistant Professor at the Department of Normal and Pathological Physiology of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation. 690002, Ostryakova Avenue, 4, Vladivostok, Russian Federation. E-mail: dr.cns@yandex.ru

Chepurnova N.S. ORCID 0000-0001-6642-1332

Markelova E.V. ORCID 0000-0001-5846-851X

Ermolitskaya M.Z. ORCID 0000-0003-2588-102X

Andrushchenko K.A. ORCID 009-005-0942-8075

Barabash P.V. ORCID 0009-0006-5548-3451

Jia Xing Yang ORCID 0009-0008-5962-2118

Meshcheryakova D.A. ORCID 0009-0003-6410-8248

Plekhova N.G. ORCID 0000-0002-8701-7213



# ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ HEALTH POLICY AND PUBLIC HEALTH

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-353-364

EDN: CZBUNM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH

## Эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2023 году

Ю.В. Михайлова<sup>1</sup> , С.А. Стерликов<sup>1</sup>  , С.Б. Пономарёв<sup>2</sup> , Е.Л. Аверьянова<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт федеральной службы исполнения наказаний Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Псковский государственный университет, г. Псков, Российская Федерация  
 [sterlikov@list.ru](mailto:sterlikov@list.ru)

**Аннотация.** *Актуальность.* Эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях России, несмотря на её значительное улучшение в последние годы, остаётся актуальным вопросом пенитенциарной медицины. Целесообразна оценка эпидемиологической ситуации по пенитенциарному туберкулёзу в России в постпандемический период и на фоне проведения специальной военной операции (СВО). Цель: оценить динамику развития эпидемической ситуации по туберкулёзу и состояние оказания фтизиатрической помощи в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2023 году. Научная новизна: впервые проведено изучение эпидемической ситуации по пенитенциарному туберкулёзу в условиях проведения специальной военной операции и в период, наступивший после пандемии COVID-19. *Материалы и методы.* Изучены данные официального (федерального и ведомственного) статистического наблюдения за 2000–2023 гг. *Результаты и обсуждение.* В 2023 г. отмечается ускорение темпа снижения заболеваемости туберкулёзом в следственных изоляторах до 15,8% ( $p < 0,001$ ) при сохранении стабильного темпа её снижения в исправительных

© Михайлова Ю.В., Стерликов С.А., Пономарёв С.Б., Аверьянова Е.Л., 2024



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

учреждениях. В целом по пенитенциарным учреждениям заболеваемость туберкулёзом снизилась с 580,4 в 2022 г. до 540,0 на 100000 в 2023 г. Доля больных туберкулёзом, впервые выявленных в пенитенциарных учреждениях, среди всех впервые выявленных больных туберкулёзом, снизилась с 6,49% в 2022 г. до 5,63% в 2023 г. Смертность от туберкулёза изменялась статистически мало (с 5,8 в 2022 г. до 4,5 на 100000 в 2023 г.;  $p=0,5$ ). Распространённость туберкулёза снизилась до 1982,3 на 100000. Доля больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ в 2023 году составила 36,4%. **Выводы.** Проведение СВО и пандемия COVID-19 не оказали негативного влияния на эпидемиологическую ситуацию по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях. Возможно некоторое позитивное влияние СВО, связанное с вовлечением в экономическую и оборонную деятельность социально уязвимых слоёв населения, что повлекло увеличение уровня их жизни, проявившееся в снижении заболеваемости туберкулёзом в следственных изоляторах до исторического минимума.

**Ключевые слова:** туберкулёз, туберкулёз у заключённых, эпидемиология туберкулёза, пенитенциарные учреждения

**Информация о финансировании.** Авторы не получали финансовой поддержки для проведения исследования, написания и публикации статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции 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 05.06.2024. Принята 09.07.2024.

**Для цитирования:** Михайлова Ю.В., Стерликов С.А., Пономарёв С.Б., Аверьянова Е.Л. Эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2023 году // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 353–364. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-353-364. EDN: CZBUNM.

## Epidemiological situation of tuberculosis in prisons of the Russian Federation in 2023

Yulia V. Mikhaylova<sup>1</sup> , Sergey A. Sterlikov<sup>1</sup>  ,  
Sergey B. Ponomarev<sup>2</sup> , Yelena L. Averyanova<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Russian Research Institute of Health, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute of the Federal Penitentiary Service, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Pskov State University, Pskov, Russia

 sterlikov@list.ru

**Abstract. Relevance.** Despite significant improvement, the epidemiological situation regarding tuberculosis in Russian prisons remains not entirely favorable. It is advisable to assess the epidemiological situation regarding penitentiary tuberculosis in Russia in the post-pandemic period and against the backdrop of a special military operation. Aim: to assess the dynamics of

the development of the tuberculosis epidemic situation and the state of provision of TB care in prisons of the Russian Federation in 2023. Scientific novelty: for the first time, a study of the epidemic situation of penitentiary tuberculosis was carried out in the context of a special military operation and in the period following the COVID-19 pandemic. *Materials and Methods*. Data from official (federal and departmental) statistical observation for 2000–2023 was studied. *Results and Discussion*. In 2023, there is an acceleration in the rate of decline in the incidence of tuberculosis in pre-trial detention centers to 15.8% ( $p < 0.001$ ), while maintaining a stable rate of decline in correctional institutions. In general, in penitentiary institutions, the incidence of tuberculosis decreased from 580,4 in 2022 to 540,0 per 100,000 in 2023. The share of new cases of tuberculosis detected in penitentiary institutions among all new cases of tuberculosis decreased from 6.49% in 2022 to 5.63% in 2023. Mortality from tuberculosis changed statistically insignificantly (from 5.8 in 2022 to 4.5 per 100,000 in 2023;  $p = 0.5$ ). The prevalence of tuberculosis fell to 1982.3 per 100,000. The proportion of patients with tuberculosis combined with HIV in 2023 was 36.4%. *Conclusion*. The special military operation and the COVID-19 pandemic did not have a negative impact on the epidemiological situation of tuberculosis in Russian prisons. There may be some positive impact of the special military operation on the epidemic situation regarding tuberculosis, associated with the involvement of socially vulnerable sections of the population in economic and defense activities, which resulted in an increase in their standard of living and a decrease in the incidence of tuberculosis, which manifested itself in a decrease in the incidence of tuberculosis in pre-trial detention centers to a historical minimum.

**Key words:** tuberculosis, tuberculosis in prisoners, epidemiology of tuberculosis, prisons

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

**Author contributions.** All the 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.

**Ethics approval** — not applicable

**Acknowledgements** — not applicable

**Consent for publication** — not applicable

Received 05.06.2024. Accepted 09.07.2024.

**For citation:** Mikhaylova YuV, Sterlikov SA, Ponomarev SB, Averyanova EL. Epidemiological situation of tuberculosis in prisons of the Russian Federation in 2023. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):353–364. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-353-364. EDN: CZBUNM.

## Введение

Пребывание в пенитенциарных учреждениях является одним из значимых факторов риска развития туберкулёза [1, 2], а также предиктором неблагоприятного исхода его лечения [3–5]. По данным метаанализа распространённость туберкулёза в тюрьмах составила 3,54% [2, 71; 4, 63], и в странах с высоким и низким бременем туберкулёза, а также в странах с доходами ниже- и выше среднего различалась менее, чем в два раза [6].

Несмотря на то, что динамика заболеваемости туберкулёзом осуждённых имеет признаки автономности как по разным учреждениям пенитенциарной

системы, так и по сравнению с населением, пенитенциарные учреждения оказывают существенное влияние на эпидемиологическую ситуацию по туберкулёзу в обществе [7]. Эпидемическая обстановка по туберкулёзу в пенитенциарном учреждении, в свою очередь, оказывает влияние на частоту латентной туберкулёзной инфекции и, соответственно, на последующий риск заболевания туберкулёзом [8]. Кроме того, пенитенциарный туберкулёз может распространяться среди гражданских лиц посредством персонала, посетителей, а также бывших заключённых, у которых туберкулёз не был вылечен во время их пребывания в пенитенциарных учреждениях [9, 10].

Постоянный приток социально-дезадаптированных больных туберкулезом из мест лишения свободы способствует отягощению медико-социальной и клинической структуры больных, наблюдаемых в противотуберкулезных учреждениях [11].

Российская Федерация входит в число 18 высокоприоритетных по туберкулезу стран европейского региона ВОЗ [2]; при этом по величине инцидентности туберкулеза Российская Федерация занимает четвертое место [12].

Несмотря на то, что эпидемиология туберкулеза и система оказания фтизиатрической помощи в Российской Федерации периодически анализируется как в специализированных изданиях, так и в научных публикациях, в последние годы сложилась особая ситуация: проведение специальной военной операции, в которой принимали участие осужденные к лишению свободы (в соответствии с федеральным законом № 61-ФЗ от 23.03.2024), могло оказать существенное влияние на эпидемическую обстановку по туберкулезу, поскольку наличие активного туберкулеза является состоянием негодности к военной службе по состоянию здоровья. Кроме того, влияние на эпидемическую обстановку по туберкулезу в пенитенциарных учреждениях России могла оказать и пандемия новой коронавирусной инфекции, официально завершившаяся в 2023 году.

Таким образом, эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в пенитенциарных учреждениях представляет глобальную проблему, актуальную, в том числе, и для Российской Федерации, а анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в пенитенциарных учреждениях в её динамике представляет актуальную задачу, особенно в условиях социальной трансформации российского общества. Цель исследования: оценить динамику развития эпидемической ситуации по туберкулезу и состояние оказания фтизиатрической помощи в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2023 году. Научная новизна: впервые проведено изучение эпидемической ситуации по пенитенциарному туберкулезу в условиях проведения специальной

военной операции и в период, наступивший после пандемии COVID-19.

## Материалы и методы

Изучены сведения официального статистического наблюдения с использованием форм федерального (№ 8 Росстата «Сведения о заболеваниях активным туберкулезом», № 61 «Сведения о ВИЧ-инфекции») и ведомственного (№ ФСИН-6 «Сведения о социально значимых заболеваниях у лиц, содержащихся в учреждениях уголовно-исполнительной системы Российской Федерации, и отдельных показателей деятельности медицинской службы», № 4-туб «Отчёт о больных туберкулезом») статистического наблюдения.

Использованы стандартные методики расчёта показателей, ранее изложенные в публикациях и статистических материалах [13–15].

Для анализа динамических рядов показателей использовали максимально доступный период; для заболеваемости, смертности и распространённости — с 2000 по 2023 гг.; для ВИЧ-инфекции — с 2002 по 2023 годы. Отдельные показатели были доступны для ретроспективного изучения за меньший период времени.

В ходе статистической обработки информации рассчитывали интенсивные и экстенсивные показатели, их 95 % доверительные интервалы (95 % ДИ) методом Уилсона, статистическую значимость межгодовых различий: вероятность статистической ошибки первого рода ( $\alpha$ ).

## Результаты и обсуждение

Ключевым показателем, отражающим напряжённость эпидемической обстановки по туберкулезу, является показатель заболеваемости туберкулезом. Для того, чтобы определить, насколько значимым было влияние на данный показатель проведение СВО, необходимо рассматривать его в динамическом ряду достаточной длины. Динамика показателя заболеваемости туберкулезом, в том числе — в следственных изоляторах (СИЗО) и исправительных учреждениях (ИУ) представлена на графике (рис. 1).

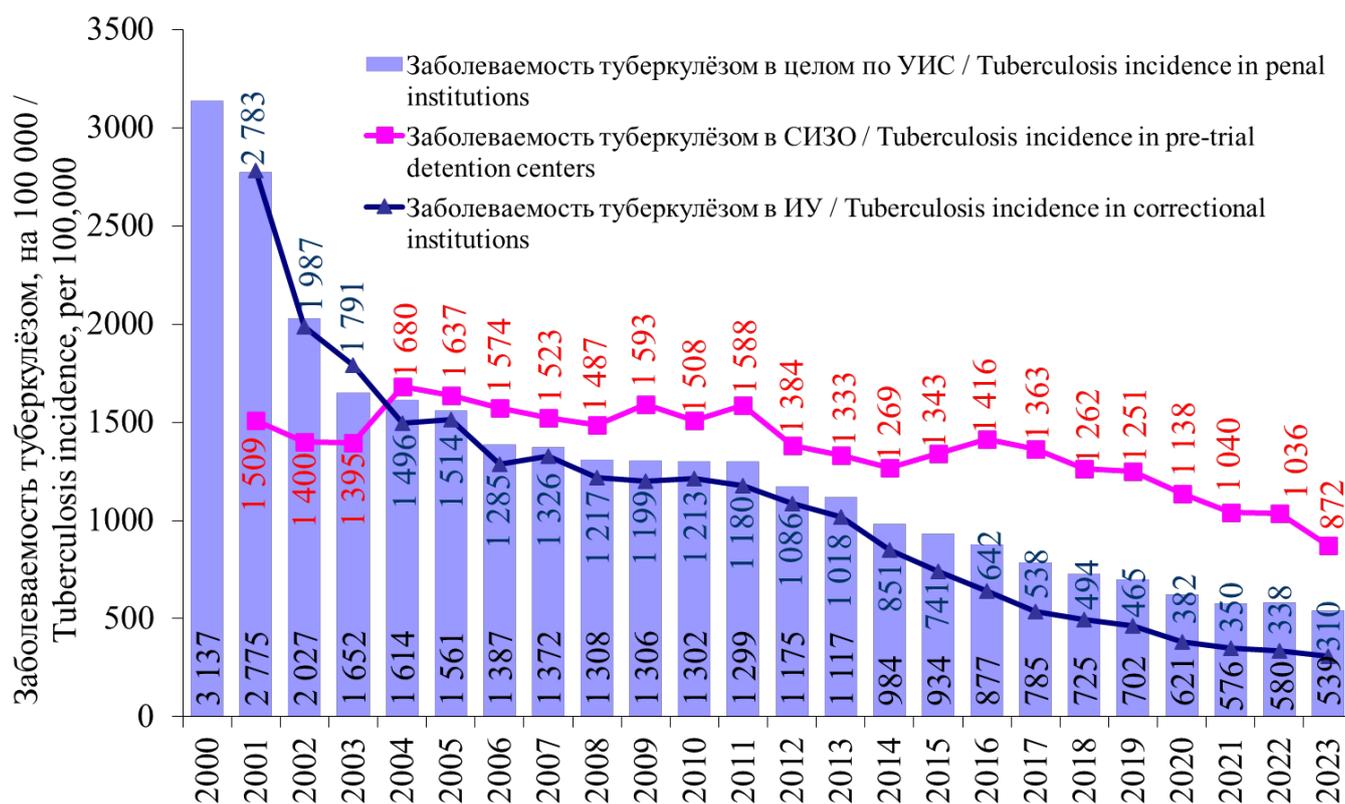


Рис. 1. Динамика показателя заболеваемости туберкулёзом в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2000–2023 гг.

Примечание: УИС – уголовно-исполнительная система; СИЗО следственные изоляторы; исправительные учреждения.

Fig. 1. Dynamics of tuberculosis incidence rate in prisons of the Russian Federation, 2000–2023

Текущие политические процессы не повлияли на темп снижения заболеваемости туберкулёзом в исправительных учреждениях, который последние 4 года оставался стабильным. Отмечалось ускорение снижения заболеваемости туберкулёзом в следственных изоляторах до беспрецедентно высокого уровня — 15,8%. С одной стороны, это может быть связано с перестройкой общества в результате происходящих политических процессов, в том числе — открытием возможностей для социально уязвимых слоёв населения, повышением их уровня жизни. С другой стороны, постоянное наращивание охвата населения профилактическими осмотрами с целью выявления туберкулёза, в том числе — до беспрецедентно высоких для постсоветского периода значений (2022 г. — 73,6% [15]) неизбежно захватывает и социально уязвимые слои населения, способствуя

выявлению среди них случаев заболевания туберкулёзом до момента совершения ими правонарушений или помещением их в следственные изоляторы. Вероятность того, что данное снижение вызвано стохастическими процессами мала ( $p < 0,001$ ). Тем не менее, заболеваемость туберкулёзом в следственных изоляторах всё ещё выше, чем в исправительных учреждениях ( $p < 0,001$ ).

Следует отметить, что стабильность снижения заболеваемости туберкулёзом в исправительных учреждениях связана со снижением числа осуждённых и, соответственно, улучшением условий их отбывания наказаний [16]. Это существенно повлияло на долю впервые выявленных больных туберкулёзом, диагностированных в учреждениях уголовно-исполнительной системы (УИС) среди всех впервые выявленных больных туберкулёзом, которая

сократилась с 6,49 % (95 %ДИ 6,27–6,72) в 2022 г. до 5,63 % (95 %ДИ 5,41–5,85) в 2023 г. ( $p < 0,001$ ).

Существенное влияние на эпидемиологическую ситуацию по туберкулёзу в УИС могут оказывать лица, поступившие в пенитенциарные учреждения с диагнозом активного туберкулёза; в 2014 г. в пенитенциарные учреждения поступило 7861 пациентов с ранее установленным диагнозом туберкулёза; в 2015 г. — 8518; 2016 — 7136; 2017 — 5252; 2018 — 5788; 2019 — 4067; 2020 — 4190; 2021 — 3782; 2022 — 5047; 2023 — 2633.

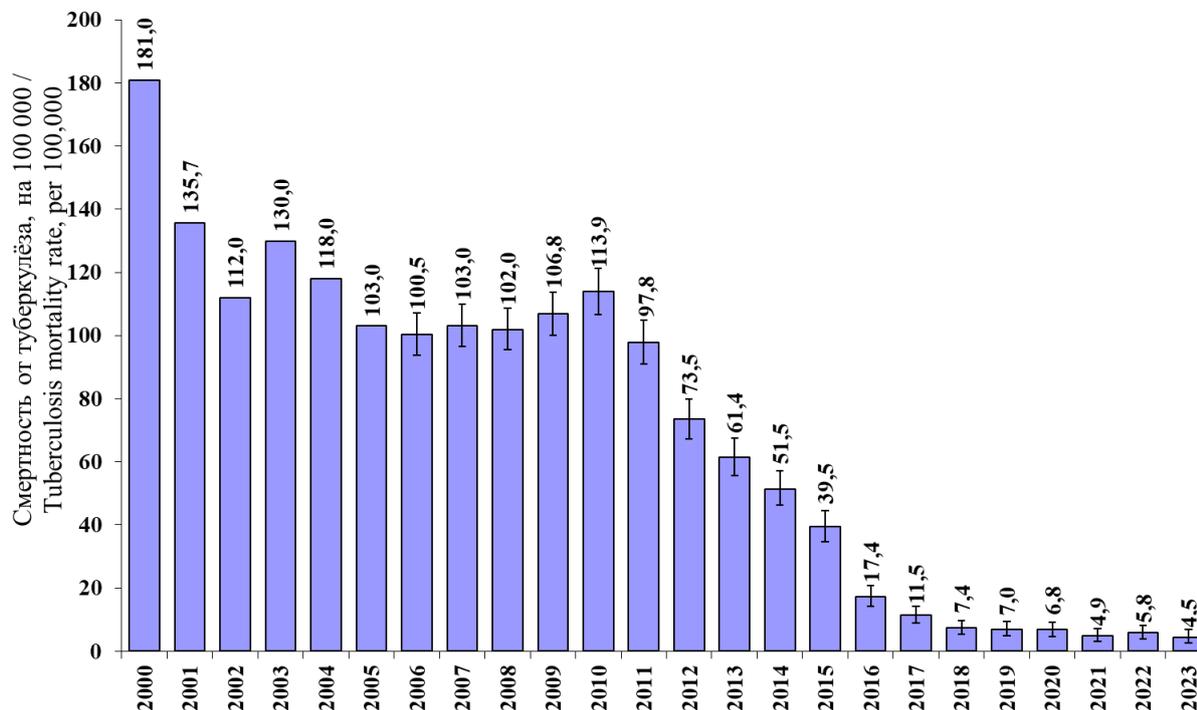
Динамика показателя смертности от туберкулёза представлена на рис. 2.

Отмечалось два периода быстрого снижения показателей: 2000–2001 гг. и 2011–2018 гг. и два периода его стабилизации: с 2001 по 2010 гг. на высоком уровне и с 2018 г. по настоящее время. Снижение показателя с 5,82 (95 %ДИ 3,80–8,27) в 2022 г. до 4,51 (95 %ДИ 2,62–6,91) в 2023 г. было статистически малозначимым ( $p = 0,5$ ); снижение

показателя в период с 2018 по 2023 гг. также было статистически малозначимым ( $p = 0,1$ ).

Для обсуждения динамики показателя смертности существенное значение имеет освобождение больных туберкулёзом, в том числе — в связи с болезнью. В 2011 из пенитенциарных учреждений было освобождено 13627 больных туберкулёзом, из них 485 — в связи с болезнью; в 2012 г. — 12204 и 387 (3,2 %), соответственно; в 2013 г. — 10924 и 337 (3,3 %); в 2014 г. — 9322 и 268 (3,1 %); в 2015 — 9027 и 303 (3,4 %); в 2016 — 9185 и 512 (5,6 %); в 2017 — 8894 и 795 (8,9 %); в 2018 — 8081 и 666 (8,2 %); в 2019 — 7730 и 606 (7,8 %); в 2020 — 5774 и 504 (8,7 %), в 2021 — 4861 и 361 (7,4 %); в 2022 — 3908 и 295 (7,5 %); в 2023 — 4113 и 281 (6,8 %).

Динамика показателя распространённости туберкулёза в пенитенциарных учреждениях России представлена на рис. 3.

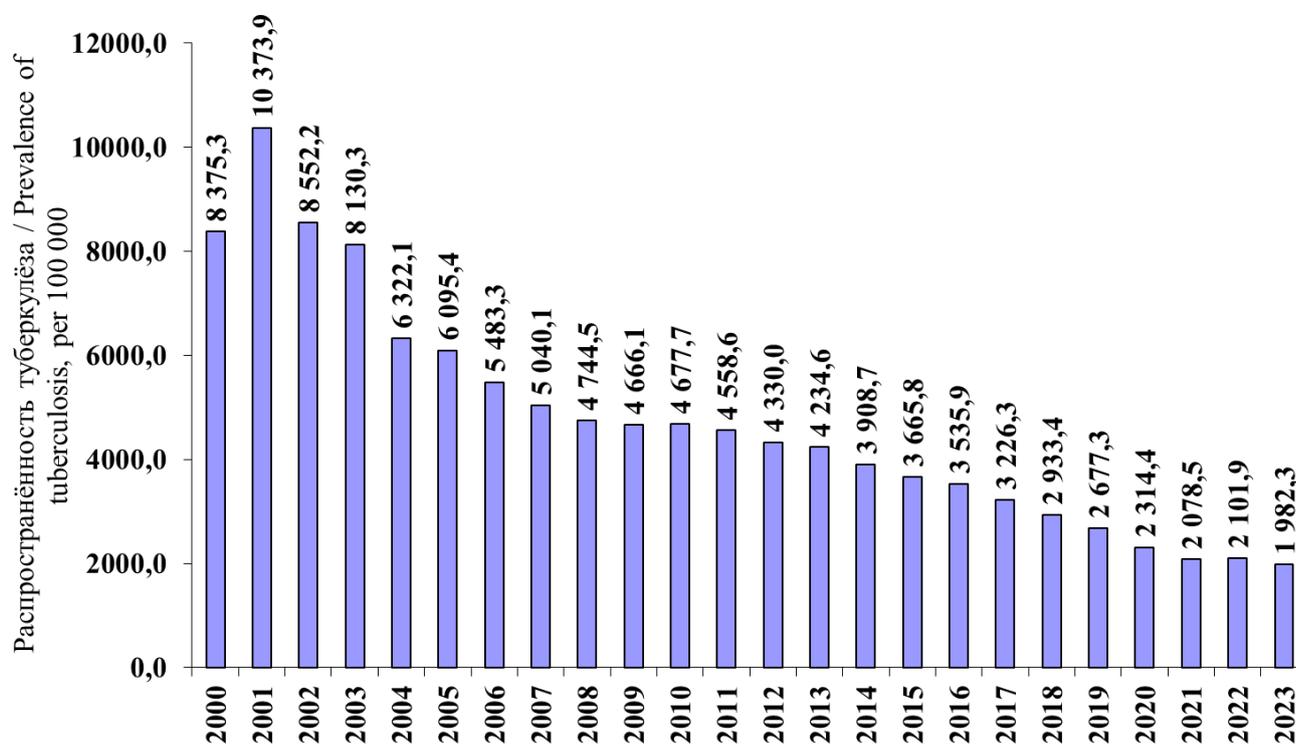


**Рис. 2.** Динамика показателя смертности от туберкулёза в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2000–2023 гг.

Примечание: Вертикальными отрезками представлены границы 95 % ДИ.

**Fig. 2.** Dynamics of the mortality rate from tuberculosis in prisons of the Russian Federation in 2000–2023.

Note: Vertical bars represent the boundaries of 95 % CI.



**Рис. 3.** Динамика показателя распространённости туберкулёза в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации в 2006–2023 гг.

**Fig. 3.** Dynamics of the prevalence of tuberculosis in prisons of the Russian Federation in 2006–2023

Быстрое снижение показателя распространённости туберкулёза с 2003 по 2004 гг. обусловлено изменением системы диспансерного наблюдения за туберкулёзом в России: исчезновением понятия «затихающий активный туберкулёз». Дальнейшее снижение показателя распространённости туберкулёза происходило на фоне снижения показателя заболеваемости туберкулёзом. В 2021–2022 гг. показатель изменялся статистически малозначимо ( $p=0,4$ ), однако в 2023 он снова снизился ( $p<0,001$ ).

Одной из существенных проблем, препятствующих в современных условиях достижению эпидемиологического благополучия по туберкулёзу, является туберкулёз в сочетании с ВИЧ-инфекцией; в целом по России перед пандемией COVID-19 данное сочетание имело у каждого пятого пациента [17]. Динамика показателей, отражающих

эпидемиологическую ситуацию по туберкулёзу в сочетании с ВИЧ-инфекцией, представлена на рис. 4.

Отмечается рост доли больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ. В то же время, в последние годы удалось добиться существенного прогресса в снижении заболеваемости туберкулёзом в сочетании с ВИЧ: если до 2017 года заболеваемость туберкулёзом лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), варьировала в пределах от 3198,3 до 4093,6 на 100 000, то в 2017 г. она снизилась до 2953,8. В 2018 г. она составила 2779,4; 2019 — 2506,0; 2020 — 2014,2; 2021 — 1930,1; 2022 — 1834,9, а в 2023 снизилась до 1728,8 на 100 000 ЛЖВ. Снижение заболеваемости туберкулёзом ЛЖВ происходило на фоне роста охвата ЛЖВ антиретровирусной терапией (АРТ).

Если в 2014 г. АРТ получал лишь каждый пятый ЛЖВ (21,7 %), то к 2017 году (начало снижение заболеваемости ЛЖВ туберкулёзом), терапией было охвачено уже 43,9 % ЛЖВ. В 2018 г. охват АРТ вырос до 52,0 %; 2019—59,5 %; 2020—89,6 %; 2021—92,4 %; 2022—94,5 %. В 2023 г. охват ЛЖВ АРТ составил рекордные 95,0 %. В то же время охват ЛЖВ химиопрофилактикой туберкулёза оставался невелик: в 2020 г. он составил 35,5 %, 2021—40,5 %; 2022—39,0 %; 2023—35,7 %.

Более высокая заболеваемость в следственных изоляторах связана, в первую очередь, с обследованием подозреваемых и обвиняемых входе входного контроля в следственных изоляторах [14]; лишь небольшая часть из них заболевает в ходе пребывания в следственных изоляторах [18].

При этом у помещённых в следственные изоляторы подозреваемых и обвиняемых имеются как управляемые (большое количество заключенных на койку, отсутствие собственного постельного белья и малое времяпрепровождение на открытом воздухе), так и неуправляемые (употребление наркотиков и низкий доход до помещения в СИЗО) факторы риска развития туберкулёза [19]. Сокращение доли больных впервые выявленных больных туберкулёзом, выявленных в учреждениях уголовно-исполнительной системы (УИС) среди всех впервые выявленных больных туберкулёзом, может привести к сокращению разрыва показателя «Доля инцидентных случаев туберкулёза среди пенитенциарной популяции в европейском регионе ВОЗ», что актуально для России [12].

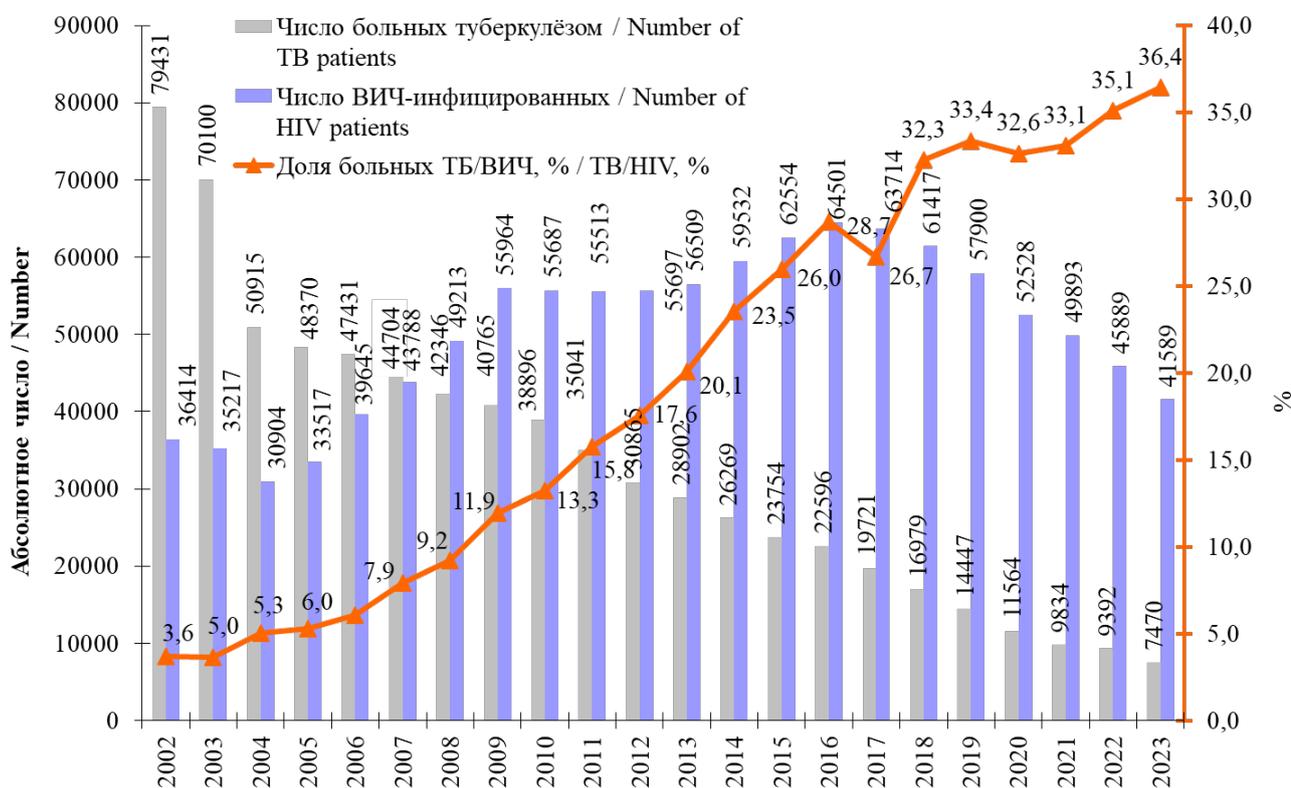


Рис. 4. Динамика числа пациентов, страдающих туберкулёзом, ВИЧ и доля больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ в пенитенциарных учреждениях России в 2002–2023 гг.

Fig. 4. Dynamics of the number of patients suffering from tuberculosis, HIV and the proportion of patients with tuberculosis in combination with HIV in Russian prisons in 2002–2023

Высокая смертность подозреваемых, обвиняемых и осуждённых от туберкулёза в 2000 г. была связана с последствиями кризисных явлений 90-х гг., которые в полной мере затронули пенитенциарные учреждения, во время которых отмечался существенный дефицит противотуберкулёзных препаратов. В 2001–2010 гг. отмечается период стабилизации показателя, связанный, с одной стороны, с ликвидацией дефицита противотуберкулёзных препаратов основного ряда, а с другой стороны — с относительно стабильной ситуацией по ВИЧ-инфекции: доля больных ко-инфекцией ВИЧ и туберкулёза в период с 2002 по 2010 г. выросла с 3,6 % до 13,3 % [12], что, однако, не могло существенно повлиять на показатель смертности от туберкулёза (случаи смерти пациентов с ко-инфекцией туберкулёза и ВИЧ, как правило, регистрируются как смерть по причине болезни, вызванной ВИЧ; по наблюдениям О.П. Фроловой и соавт. [20], в половине наблюдений за больными туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, завершившимися летальным исходом, он не был связан с туберкулезом). С другой стороны, даже такой рост доли пациентов с ко-инфекцией ВИЧ и туберкулёза компенсировался ростом доли пациентов с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулёза, что является фактором риска роста летальности от туберкулёза. Всё это происходило на фоне снижения заболеваемости подозреваемых, обвиняемых и осуждённых от туберкулёза. Сочетание четырёх перечисленных факторов приводило к равновесию показателя смертности от туберкулёза. Дальнейшее снижение показателя смертности могло быть обусловлено несколькими тенденциями: существенным сокращением заболеваемости туберкулёзом, ростом доли больных туберкулёзом в сочетании ВИЧ (к 2018 г. до 32,3 %), внедрением программ лечения туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, а также (с 2016 года) рост освобождения больных туберкулёзом в связи с болезнью, что приводило к занижению показателя смертности от туберкулёза в УИС.

Замедленная динамика показателя распространённости туберкулёза в 2021–2022 гг. во многом связана с замедленной динамикой снижения выявления случаев туберкулёза при входном контроле в следственных изоляторах, а также увеличением на 2 тыс. человек с активным туберкулёзом из числа вновь арестованных, которые определяют приток больных туберкулёзом в учреждения УИС. В 2023 г. продолжилось снижение числа вновь арестованных больных туберкулёзом, что также способствовало дальнейшему снижению показателя распространённости. Не исключено, что некоторую роль в снижении распространённости туберкулёза в 2023 г. могла сыграть и частичная мобилизация здоровых осуждённых, однако гораздо большее влияние могла оказать система расширения альтернативных наказаний.

В пенитенциарных учреждениях традиционно отмечается более высокая доля больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ, что связано с характером социальной адаптации и криминальной деятельности контингента. Если в предпандемический период в гражданском здравоохранении туберкулёз в сочетании с ВИЧ был у каждого пятого пациента — 20,3 % [17], то в это же время в пенитенциарных учреждениях ВИЧ-инфекция отмечалась у каждого третьего больного туберкулёзом (33,4 %). Доля больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ в 2022 году в гражданском здравоохранении составляла 26,1 % [15], в то время как в пенитенциарных учреждениях она, даже на фоне существенного снижения заболеваемости туберкулёзом ЛЖВ, составила 35,1 %. Это свидетельствует о том, что заболеваемость туберкулёзом подозреваемых, обвиняемых и осуждённых, не имеющих ВИЧ-инфекции, снижается быстрее, чем заболеваемость туберкулёзом ЛЖВ. Переломить данную ситуацию можно двумя способами: во-первых, усилить контроль соблюдения АРТ путём применения мер социальной поддержки при контролируемом приёме АРТ; во-вторых — нарастить охват ЛЖВ химиопрофилактикой туберкулёза, который пока невелик. По мнению И.В. Шукиной и соавт., целесообразным представляется выявление у лиц,

поступающих в следственные изоляторы, кризисных состояний, провоцирующих снижение иммунитета, с последующим проведением контролируемой химиопрофилактики туберкулёза [21]. Однако следует помнить, что при внедрении всех профилактических мероприятий не изменится заболеваемость туберкулёзом ЛЖВ, у которых туберкулёз был выявлен во время входного контроля в следственном изоляторе; ответственными за показатель заболеваемости туберкулёзом в СИЗО следует считать, прежде всего, медицинские организации гражданского здравоохранения, осуществляющие массовые профилактические осмотры населения с целью выявления туберкулёза.

## Выводы

Проведение специальной военной операции не оказало негативного влияния на эпидемиологическую ситуацию по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях. Возможно некоторое позитивное влияние СВО, связанное с вовлечением в экономическую и оборонную деятельность социально уязвимых слоёв населения, что повлекло увеличение уровня их жизни, проявившееся в снижении заболеваемости туберкулёзом в следственных изоляторах, а также числа поступивших больных туберкулёзом до исторического минимума. Отмечаются стабильно низкие показатели смертности от туберкулёза, обусловленные улучшением эпидемиологической ситуации по туберкулёзу и освобождением пациентов с далеко зашедшими его формами. Снижается распространённость туберкулёза, отмечается рост доли пациентов с ТБ/ВИЧ на фоне снижения заболеваемости туберкулёзом ЛЖВ, что требует дальнейшего совершенствования профилактики туберкулёза у ЛЖВ, в том числе — улучшение соблюдения антиретровирусной терапии и охвата ЛЖВ химиопрофилактикой туберкулёза.

## Библиографический список

1. Global tuberculosis report 2023: Tuberculosis in prisons. – URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/>

tb-reports/global-tuberculosis-report-2023/featured-topics/tb-in-prisons [Дата доступа 24 декабря 2023].

2. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2022: 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2022. 176 p. doi: 10.2900/488579.

3. Belilovsky E.M., Borisov S.E., Cook E.F., Shaykevich S., Jakubowiak W.M., Kourbatova E.V. Treatment interruptions among patients with tuberculosis in Russian TB hospitals // International Journal of Infectious Diseases. 2010. V. 14. Issue 8. P. 698–703. doi: 10.1016/j.ijid.2010.03.001.

4. Lesnic E., Niguleanu A., Ciobanu S., Todoriko L. Predictive factors associated to low tuberculosis treatment outcome: cross sectional study // The Moldovan Medical Journal. 2017. V. 60. № 2. P. 7–12. DOI: 10.5281/zenodo.1050982.

5. Бородулина Е.А., Маткина Т.Н., Вдоушкина Е.С. Причины смерти больных ВИЧ-инфекцией и туберкулёзом // Туберкулёз и болезни лёгких, 2015. № 5. С. 44–45.

6. Placeres A.F., de Almeida Soares D., Delpino F.M., Moura H.S.D., Scholze A.R., Dos Santos M.S., Arcêncio R.A., Fronteira I. Epidemiology of TB in prisoners: a metanalysis of the prevalence of active and latent TB // BMC Infect Dis. 2023. V. № 1. P. 20. doi: 10.1186/s12879-022-07961-8

7. Шугарова С.Н., Орыцак С.Е., Савилов Е.Д. Тенденции и взаимосвязи заболеваемости туберкулезом в пенитенциарной системе // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022. Т. 21. № 4. С. 89–94. doi: 10.31631/2073-3046-2022-21-4-89-94

8. Zhang G., Zhang Y., Zhong D., Meng S., An L., Wei W., Zhang Z., Fu Y., Wang X. High Prevalence of and Risk Factors for Latent Tuberculosis Infection among Prisoners, Tianjin, China // Emerg Infect Dis. 2020. V. 26. № 3. P. 516–522. doi: 10.3201/eid2603.190891.

9. Stuckler D., Basu S., McKee M., King L. Mass incarceration can explain population increases in TB and multidrug-resistant TB in European and central Asian countries // Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. V. 105. P. 13280–13285. doi:10.1073/pnas.0801200105

10. Barbour V., Clark J., Jones S., Veitch E. The health crisis of tuberculosis in prisons extends beyond the prison walls // PLoS Med. 2010. V. 7. e1000383. doi:10.1371/journal.pmed.1000383

11. Апханова Н.С., Душина Е.В., Салацкая Н.В. Роль пенитенциарной системы в эпидемиологической ситуации по туберкулёзу в Иркутской области. Актуальные вопросы общественного здоровья и здравоохранения на уровне субъекта Российской Федерации : материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 100-летию Иркутского государственного медицинского университета (1919–2019). Т. 1 / Под общей редакцией Г.М. Гайдарова. Иркутск, 2019. С. 100–105.

12. Стерликов С.А., Кудрина В.Г., Михайлова Ю.В., Дюжева Е.В. Статистический обзор эпидемиологической ситуации по туберкулёзу в пенитенциарных учреждениях (мира, Европы, России) // Медицинский вестник МВД. 2024. № 2. С. 79–83. doi: 10.52341/20738080\_2024\_129\_2\_79

13. Стерликов С.А., Белиловский Е.М., Пономарёв С.Б., Постольник Г.А. Эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу в учреждениях уголовно-исполнительной системы // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2018. № 4. С. 1–21.

14. Кудрина В.Г., Стерликов С.А. К вопросу расчёта показателей первичной заболеваемости и смертности от нозологий,

выявляемых в ходе входного скрининга в следственных изоляторах. Пенитенциарная медицина в России и за рубежом, сборник научных статей, составленных по материалам VII межведомственной научно-практической конференции «Пенитенциарная медицина в России и за рубежом» / под ред. С.Б. Пономарёва. Москва: ФКУ НИИ ФСИН России, 2022. С. 16–18.

15. Васильева И.А., Стерликов С.А., Тестов В.В., Михайлова Ю.В., Голубев Н.А., Кучерявая Д.А., Гордина А.В., Пономарёв С.Б. Ресурсы и деятельность противотуберкулёзных организаций Российской Федерации в 2021–2022 гг. (статистические материалы). Москва: РИО ЦНИИОИЗ, 2023. 94 с.

16. Маслов В.А. Доминирование лишения свободы в структуре назначаемых наказаний: проблемы правоприменительной практики // Актуальные проблемы российского права. 2023. Т. 18. № 3. С. 131–145. doi: 10.17803/1994-1471.2023.148.3.131-145

17. Цибикина Э.Б. Туберкулёз, сочетанный с ВИЧ-инфекцией, в России в период до и во время пандемии COVID-19 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2022. Т. 14, № 4. С. 29–35. doi: 10.22328/2077-9828-2022-14-4-29-35

18. Аверьянова Е.Л. Роль учреждений ФСИН в противодействии распространению туберкулёза среди населения России. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2022. № 4. С. 316–333. doi: 10.24412/2312-2935-2022-4-316-333

19. Lobacheva T., Asikainen T., Giesecke J. Risk factors for developing tuberculosis in remand prisons in St. Petersburg, Russia - a case-control study // Eur. J. Epidemiol. 2007. V. 22. № 2. P. 121–127. doi: 10.1007/s10654-006-9068-z.

20. Фролова О.П., Бутыльченко О.В., Стаханов В.А., Ениленец И.И., Роменко М.А., Мартель И.И. Причины летальных исходов среди больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией // Национальное здравоохранение. 2021. Т.2. № 1. С. 59–62. doi:10.47093/2713-069X.2021.2.1.59-62

21. Щукина И.В., Усачев В.Н., Фролова О.П., Ильин В.В., Султанов Л.В., Карпова Л.Н. Оптимизация подходов к профилактике туберкулёза в пенитенциарных учреждениях // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2016. Т. 88. № 3. С. 45–49.

## References

1. Global tuberculosis report 2023: Tuberculosis in prisons. – URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023/featured-topics/tb-in-prisons> [Accessed 2023 Dec 24].

2. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2022: 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2022. 176 p. doi: 10.2900/488579

3. Belilovsky EM, Borisov SE, Cook EF, Shaykevich S, Jakubowiak WM, Kourbatova EV. Treatment interruptions among patients with tuberculosis in Russian TB hospitals. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(8):698–703. doi: 10.1016/j.ijid.2010.03.001

4. Lesnic E, Niguleanu A, Ciobanu S, Todoriko L. Predictive factors associated to low tuberculosis treatment outcome: cross sectional study. *The Moldovan Medical Journal*. 2017(60);2:7–12. doi: 10.5281/zenodo.1050982

5. Borodulina YeA, Matkina TN, Vdoushkina YeS. Causes of death in patients with HIV infection and tuberculosis // *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2015;(5):44–45. (In Russian).

6. Placeres AF, de Almeida Soares D, Delpino FM, Moura HSD, Scholze AR, Dos Santos MS, Arcêncio RA, Fronteira I. Epidemiology of TB in prisoners: a metanalysis of the prevalence of active and latent TB. *BMC Infect Dis*. 2023. 23(1):20. doi: 10.1186/s12879-022-07961-8

7. Shugarova SN, Oryshchak SYe, Savilov YeD. Trends and relationships of tuberculosis incidence in the penitentiary system. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(4):89–94. doi: 10.31631/2073-3046-2022-21-4-89-94 (In Russian).

8. Zhang G, Zhang Y, Zhong D, Meng S, An L, Wei W, Zhang Z, Fu Y, Wang X. High Prevalence of and Risk Factors for Latent Tuberculosis Infection among Prisoners, Tianjin, China. *Emerg Infect Dis*. 2020. 26(3):516–522. doi: 10.3201/eid2603.190891

9. Stuckler D, Basu S, McKee M, King L. Mass incarceration can explain population increases in TB and multidrug-resistant TB in European and central Asian countries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:13280–13285. doi: 10.1073/pnas.0801200105

10. Barbour V, Clark J, Jones S, Veitch E. The health crisis of tuberculosis in prisons extends beyond the prison walls. *PLoS Med*. 2010;7:e1000383. doi:10.1371/journal.pmed.1000383

11. Apkhanova N.S., Dushina Ye.V., Salatskaya N. The role of the penitentiary system in the epidemiological situation of tuberculosis in the Irkutsk region. Current issues of public health and healthcare at the level of a constituent entity of the Russian Federation: materials of the All-Russian scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of Irkutsk State Medical University (1919–2019). Volume 1. Ed. G.M. Gaidarova. Irkutsk, 2019:100–105. (In Russian).

12. Sterlikov SA, Kudrina VG, Mikhaylova YuV, Dyuzheva YeV. Statistical review of the epidemic situation of tuberculosis in penitentiary institutions (world, Europe, Russia). *MIA Medical bulletin*. 2024;129(2):79–83. doi: 10.52341/20738080\_2024\_129\_2\_79 (In Russian).

13. Sterlikov SA, Belilovskiy YeM, Ponomarev SB, Postol'nik GA. The epidemiological situation of tuberculosis in the institutions of the penitentiary system. *Current problems of health care and medical statistics*. 2018;(4):1–21. (In Russian).

14. Kudrina VG, Sterlikov SA. On the issue of calculating primary morbidity and mortality rates from nosologies identified during entry screening in pre-trial detention centers. Penitentiary medicine in Russia and abroad, a collection of scientific articles compiled based on the materials of the VII interdepartmental scientific and practical conference “Penitentiary medicine in Russia and abroad” / ed. S.B. Ponomarev. Moscow: Scientific Research Institute of the Federal Penitentiary Service of Russia. 2022:16–18. (In Russian).

15. Vasilyeva IA, Sterlikov SA, Testov VV, Mikhailova YuV, Golubev NA, Kucheryavaya DA, Gordina AV, Ponomarev SB. Resources and activities of anti-tuberculosis organizations of the Russian Federation in 2021–2022. (statistical materials). Moscow: Russian Research Institute of Health, 2023. 94 p. (In Russian).

16. Maslov VA. The dominance of imprisonment in the structure of imposed punishments: problems of law enforcement practice. *Current problems of Russian law*. 2023;18(3):131–145. doi: 10.17803/1994-1471.2023.148.3.131-145 (In Russian).

17. Tsybikova EB. Tuberculosis combined with HIV infection in Russia in the period before — and during the COVID-19 pandemic. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2022;14(4):29–35. doi:10.22328/2077-9828-2022-14-4-29-35 (In Russian).

18. Averyanova EL. The role of the prisons in countering the spread of tuberculosis among the population of Russia. *Current problems of health care and medical statistics*. 2022;(4):316–333. doi: 10.24412/2312-2935-2022-4-316-333 (In Russian).

19. Lobacheva T, Asikainen T, Giesecke J. Risk factors for developing tuberculosis in remand prisons in St. Petersburg, Russia - a case-control study. *Eur. J. Epidemiol.* 2007. 22;(2):121–127. doi: 10.1007/s10654-006-9068-z.

20. Frolova OP, Butylchenko OV, Stakhanov VA, Enilenis II, Romanenko MA, Martel II. Causes of death in patients with tuberculosis

and human immunodeficiency virus co-infection. *National Health Care (Russia)*. 2021;2(1):59-62. doi:10.47093/2713-069X.2021.2.1.59-62. (In Russian).

21. Shchukina IV, Usachev VN, Frolova OP, Ilyin VV, Sultanov LV, Karpova LN. Optimization of approaches to the prevention of tuberculosis in penitentiary institutions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;(3):45–49. (In Russian).

*Ответственный за переписку:* Стерликов Сергей Александрович – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник федерального государственного

бюджетного учреждения «центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127254, г. Москва, ул. Добролюбова, д. 11. E-mail: sterlikov@list.ru

Михайлова Ю.В. SPIN 2207-0492; ORCID 0000-0001-6779-726X

Стерликов С.А. SPIN 8672-4853; ORCID 0000-0001-8173-8055

Пономарёв С.Б. SPIN 4646-6870; ORCID 0000-0002-9936-0107

Аверьянова Е.Л. SPIN 7224-2171; ORCID 0000-0001-7925-6639

*Corresponding author:* Sterlikov Sergey Aleksandrovich – PhD, MD, Doctor of Medical Sciences, Chief researcher in Russian Research Institute of Health. 127254, Dobrolubova st., 11, Moscow, Russian Federation. E-mail: sterlikov@list.ru

Mikhaylova Yu.V. ORCID 0000-0001-6779-726X

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

Ponomarev S.B. ORCID 0000-0002-9936-0107

Averyanova E.L. ORCID 0000-0001-7925-6639



# IMMUNOLOGY ИММУНОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-365-376  
EDN: DJROAN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH

## Influence of muramyl peptides on the production of chemokines, growth factors, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines

Svetlana V. Guryanova<sup>1,2</sup>  

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

<sup>2</sup> RUDN University, Moscow, Russian Federation

 [svgur@mail.ru](mailto:svgur@mail.ru)

**Abstract: Relevance.** The recent increase in inflammatory, allergic and infectious diseases needs to update new ways of raising non-specific resistance of the organism. Innate immunity provides the first line of defense against pathogens through the activation of receptors that detect microorganisms: TLRs, NLRs and CLRs. Muramyl peptides that form the cell wall of all known bacteria are recognized by NLRs and trigger immune responses to eliminate pathogens. The aim of this study was to investigate the effect of muramyl peptides on the production of chemokines, growth factors, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by human mononuclear cells. **Materials and Methods.** Mononuclear cells were isolated from the peripheral blood of healthy volunteers using the Cell Separation Media Lympholyte CL 5015 reagent and cultured for 4 hours in the presence of glucosaminyl muramyl dipeptides GMDP, GMDP-OH, GMDP-Lys, GMDP-LL; an adequate amount of medium was added to the control wells. The levels of chemokines, growth factors, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines were measured using magnetic beads with antibodies according to the manufacturer's instructions Luminex 200, Merck (Millipore) equipment, and software (Burlington, Massachusetts, USA). **Results and Discussion.** It was found that muramyl peptides GMDP, GMDP-ON and GMDP-Lys enhance the production of cytokines IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF. GMDP-LL does not affect the production of cytokines. At the same time, muramyl peptides with the L-configuration of alanine and the D-configuration of isoglutamine (L-D muramyl peptides) did not change the values of IL-2, IL-3, IL-5, IL-9. **Conclusion.** The

© Guryanova S.V., 2024



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

D-configuration of isoglutamine is fundamental for the implementation of the regulatory activity of muramyl peptides. A wide range of bacterial bioregulators, the source of which are microorganisms, regulate the host homeostasis and trigger immune reactions, which, depending on the context, can have opposite effects. L-D muramyl peptides activate mononuclear cells, which begin to produce proinflammatory cytokines and chemokines, as well as growth factors necessary for the destruction of pathogens. In addition, anti-inflammatory cytokines are also triggered, which have a regulatory role in the appearance of memory cells and the weakening of inflammatory reactions. Thus, normally, muramyl peptides participate in maintaining tolerance to microflora and maintaining immune homeostasis.

**Keywords:** innate immunity, immune homeostasis, tolerance, glucosaminylmuramyl dipeptide, muramyl peptide, inflammation regulation, bacterial bioregulators, NOD2

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

**Author Contributions:** The author read and agreed to the final version of the manuscript.

**Conflicts of interest statement.** The author declares that there is no conflict of interest.

**Acknowledgments** — not applicable.

**Ethics approval.** The study protocol was approved by Ethics Committee of the Medical Institute of RUDN University, Moscow, Russia.

**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 07.12.2023. Accepted 15.01.2024.

**For citation:** Guryanova SV. Influence of muramyl peptides on the production of chemokines, growth factors, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):365–376. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-365-376. EDN: DJROAN.

## Introduction

Muramyl peptides are key components of the cell wall of gram-positive and gram-negative bacteria [1]. N-acetylmuramic acid is synthesized exclusively in prokaryotic organisms and, together with N-acetylglucosamine and peptides that cross-link these polymer chains, forms the peptide glycan framework of the bacterial cell wall [2, 3]. In gram-positive bacteria, the peptide glycan layer is several times thicker than in gram-negative bacteria [4]. In gram-negative bacteria, an outer membrane with lipopolysaccharides of various chemical structures [5, 6] is located on top of the peptide glycan layer, determining the species and strain specificity of bacteria [7–9]. However, recent studies

using advanced imaging techniques have revealed that lipopolysaccharides are embedded in the bacterial outer membrane as discrete regions that form islands in the bacterial outer membrane [10]. During growth, bacteria remodel the peptide glycan framework using their own autolysin enzymes, with a significant portion (up to 50%) of the resulting muramyl peptides being reused by the bacterium, and some muramyl peptides ending up in the extracellular environment [11–13]. Muramyl peptides and lipopolysaccharides are pathogen-associated molecular patterns that activate innate immune receptors and ensure an adequate response of the macroorganism to pathogenic and commensal microflora [14–16].

The mechanism of action of muramyl peptides is based on recognition by innate immune receptors

such as Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1 and 2 (NOD1, NOD2) of intracellular localization in all cells of the body [17, 18]. Interaction of muramyl peptides with NOD1 or NOD2 triggers a cascade of signaling pathways leading to activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and release of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interferon gamma (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). This process plays an important role in protecting the body from bacterial and viral infections. It is known that mutations in the NOD2 gene are associated with Crohn's disease, a chronic inflammatory bowel disease, which served as an additional incentive for a detailed study of the signaling pathways triggered by muramyl peptides [19–21]. It was determined that the functioning of NOD2 is a necessary condition for maintaining the functioning of innate and acquired immunity [18]. Maintaining the integrity of the epithelial barrier is the main condition for preventing the penetration of microorganisms by transepithelial transport and the occurrence of inflammation, and as a consequence, the occurrence of various diseases affecting all systems and organs [22–24]. Understanding the features of the interaction of muramyl peptides with epithelial cells, as well as with various immunocompetent cells, can lead to the development of therapies aimed at modulating NOD2 activity and regulating the immune response. In particular, enhancing the immune response with muramyl peptides can be used in primary immunodeficiencies, while activation of neutrophilic granulocytes and the macrophage link of immunocompetent cells can compensate for insufficient production of immunoglobulins [25]. Medicines based on muramyl peptides have proven effective in the prevention of seasonal respiratory infections and in the rehabilitation of patients who have had COVID19 [26, 27]. Studies show that muramyl peptides can be effective adjuvants for vaccines [28–30]. Adjuvants enhance the immune response to an antigen, which is especially important for vaccines against hard-to-detect pathogens. In particular, muramyl peptides stimulate the production of antibodies and increase the activity of macrophages, neutrophilic granulocytes, and natural killer cells, which

makes them valuable in the development of vaccines against bacterial and viral infections [31, 32]. Medicines based on muramyl peptides have proven effective in the prevention of acute respiratory diseases [26].

In addition, muramyl peptides are being studied as potential therapeutic agents for autoimmune diseases. At the same time, muramyl peptides can both aggravate the course of an autoimmune disease, for example, in ultra-high concentrations in ankylosing spondylitis, and alleviate it, for example, when taken during remission in psoriasis [33, 34]. Understanding the effect of muramyl peptides in these pathologies can lead to the development of new strategies for the treatment and diagnosis of such diseases.

The triggering of anti-inflammatory reactions along with pro-inflammatory reactions may be one of the possible explanations for the discovered multidirectional effects of muramyl peptides. At the same time, anti-inflammatory reactions manifest themselves with a significant lag in time and intensity compared to pro-inflammatory ones [35].

The main interest in muramyl peptides is explained by their ability to activate innate immunity, which makes them promising agents for the prevention of socially significant diseases, as well as the development of new therapeutic and diagnostic methods. The prospects for the use of muramyl peptides in biomedicine continue to expand [32]. New studies are aimed at modifying the structure of muramyl peptides to increase their effectiveness and specificity [36–39]. The development of synthetic analogs of muramyl peptides that may have improved properties and reduced toxicity, as well as the study of their immunomodulatory properties is an important direction in the development of new preventive and therapeutic agents to increase non-specific resistance.

## Materials and methods

### Muramyl peptides

Muramyl peptides were synthesized in the laboratory of peptide chemistry of M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Moscow, Russia) [40]. The chemical structure of muramyl peptides is presented in the figure 1.

M g/mol	Muramyl peptide	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
695	GMDP	NH <sub>2</sub>	OH	GlcNAcβ1
696	GMDP-OH	OH	OH	GlcNAcβ1
839	GMDP-Lys	NH <sub>2</sub>	Lys	GlcNAcβ1
695	GMDP-LL	NH <sub>2</sub>	OH	GlcNAcβ1

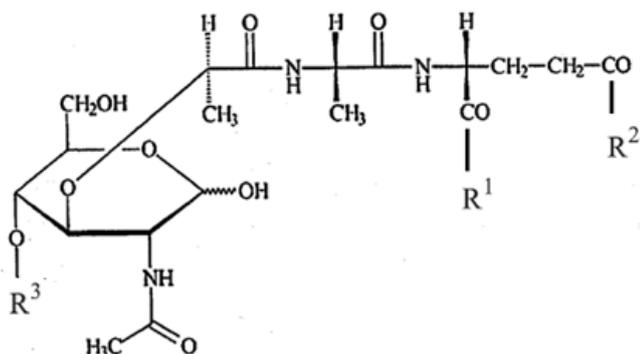


Fig. Chemical structure of muramyl peptides

### Isolation of mononuclear cells

Venous blood was collected in the tubes (Vacuette, Greiner Bio-One, Austria) with an anticoagulant (0.1 ml of a 2.7 % K<sub>2</sub>EDTA salt solution; pH 7.2-7.4 per 1 ml of blood). Whole blood was diluted 1:3 with phosphate-buffered saline PBS (Paneco, Russia), layered on Cell Separation Media Lympholyte CL 5015 (Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada) and centrifuged for 40 minutes at 400 G. Mononuclear cells (MNCs) were washed twice in complete RPMI 1640 medium (Merk, Germany) containing 10 % fetal bovine serum (Merk, Germany), 100 U/ml penicillin (Merk, Germany), 100 µg/ml streptomycin (Merk, Germany) and 10 mM HEPES buffer (Merk, Germany). Cell viability was determined by trypan blue staining (Paneco, Russia).

### Cultivation of human mononuclear cells in the presence of muramyl peptides

Mononuclear cells were added to the wells of a 96-well plate (Costar, Washington, WA, USA), at 0.2x10<sup>5</sup> per well, muramyl dipeptides were added at a final concentration of 5 µg/ml and an equal volume of medium to control wells. The cells were incubated for 4 hours at 37 °C in a 5 % CO<sub>2</sub> 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). Supernatants of mononuclear cells were analyzed according to the manufacturer's instructions.

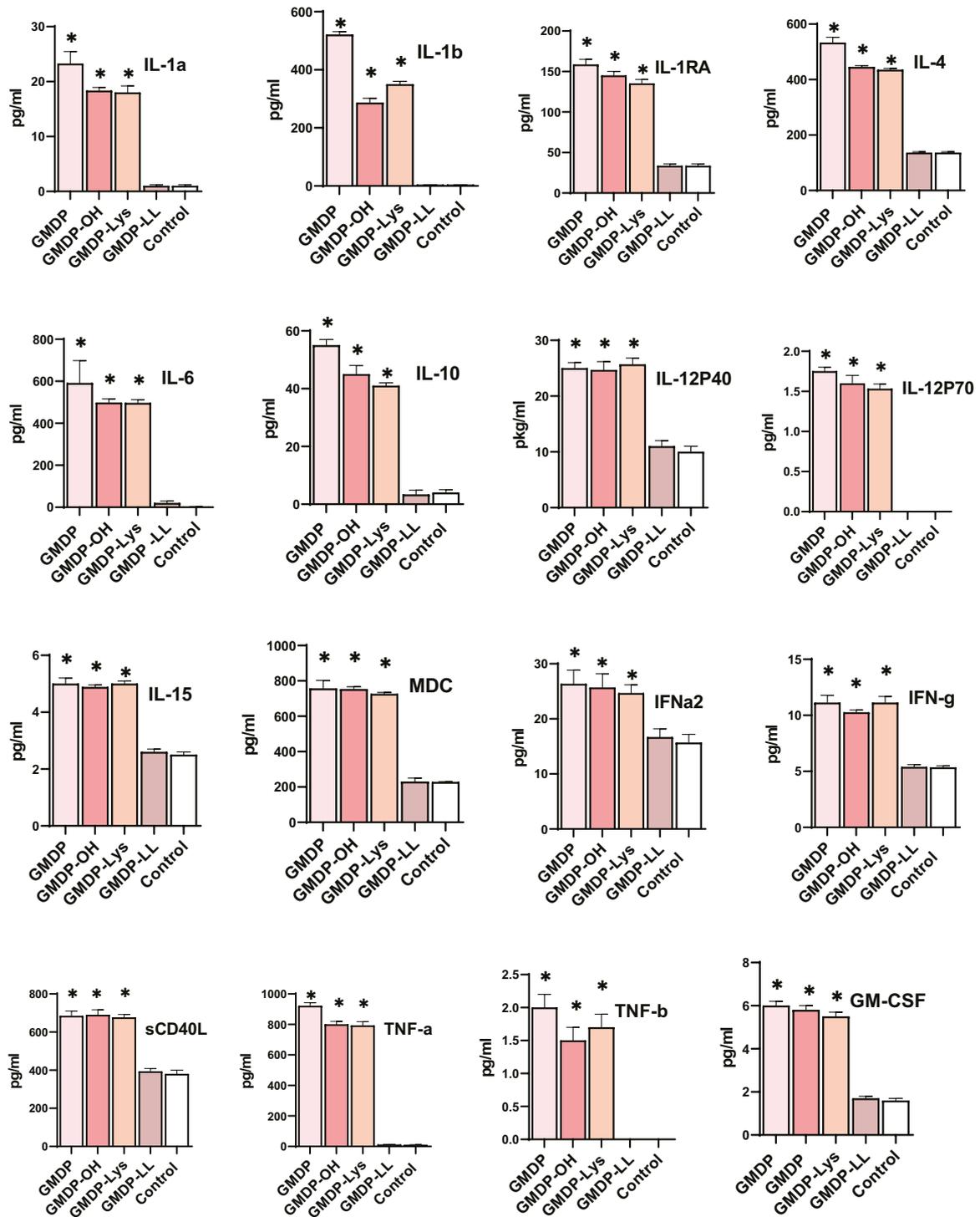
### Statistics

Statistical processing of the data was performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). 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 significant.

### Results and discussion

For the first time, the ability of muramyl peptides GMDP, GMDP-ON, GMDP-Lys and GMDP-LL to influence the production of cytokines IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFNα2, IFN-γ, TNF-α, TNF-β, GM-CSF was studied on mononuclear cells of healthy donors. It was found that GMDP-LL does not affect the production of cytokines, which is consistent with previously obtained data on the induction of nitric oxide expression. At the same time, muramyl peptides with the L-configuration of alanine and the D-configuration of isoglutamine (L-D muramyl peptides) increased IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFNα2, IFN-γ, TNF-α, TNF-β, GM-CSF and did not change the values of IL-2, IL-3, IL-5, IL-9 (data not shown).

Studies have found that L-D muramyl peptides (GMDP, GMDP-OH and GMDP-Lys) stimulate the production of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α, which are involved in acute and systemic inflammation [41, 42]. Moreover, the maximum effect was observed with the induction of IL-1β (up to 520 pg/ml), IL-6 (up to 595 pg/ml) and TNF-α (up to 930 pg/ml). GMDP turned out to be the most active of the muramyl peptides studied (Figure 2).



**Fig. 2.** Effect of muramyl peptides on the production of chemokines, growth factors, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines

Note: \* – p < 0.05 – compared to control values.

Interestingly, L-D muramyl peptides stimulate the production of not only pro-inflammatory cytokines IL-1a and IL-1b, but also their antagonist, the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA). This fact demonstrates the ability of L-D muramyl peptides to control both pro- and anti-inflammatory processes.

A 3-fold increase in IL-4 under the influence of GMDP-OH and GMDP-Lys, and a 4-fold increase under the influence of GMDP may be important when combined with antigens that have allergenic properties, which should also be taken into account when prescribing drugs based on muramyl peptides during an exacerbation of allergy [43].

The cytokine IL-10, which regulates the balance of the immune response, may reduce the expression of Th1 cytokines, MHC class II antigens and costimulatory molecules on macrophages, it can also suppress the activity of macrophages and dendritic cells [44, 45]. IL-10 increased under the influence of GMDP to 56 µg/ml, which indicates the possibility of its use in case of loss of the ability of Th17 to produce IL-10 and prevention of acquisition of the pathogenic phenotype of Th17.

Under the influence of GMDP, GMDP-OH and GMDP-Lys the content of IL-12P40 and IL-12P70, which are subunits of the cytokine IL-12[46], significantly increased. In macrophages, IL-12P40 increases the production of both pro- and anti-inflammatory molecules [47]. IL-12 promotes differentiation of T cells into long-lived Th1-polarized memory cells [48]. The obtained data explain the previously registered ability of muramyl peptides to promote an increase in Th1 cells, observed when using a GMDP-based drug in patients with atopic bronchial asthma [49]. L-D muramyl peptides more than doubled IL-15, which is responsible for the growth and differentiation of T, B, lymphocytes, natural killers and dendritic cells, and also enhances the cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T cells [50–52].

Notably, MDC (a chemokine derived from macrophages) increased more than threefold under the influence of L-D muramyl peptides. MDC is involved in the formation and functioning of the thymus, attracting monocytes, dendritic cells and

natural killer cells, and also performs the functions of regulating immune responses of the skin [53–55]. L-D muramyl peptides (GMDP, GMDP-OH and GMDP-Lys) increased the production of type I (IFNα2) and type II (IFNγ) interferons by 50 % and 100 %, respectively. IFNα2 has antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activity, and is often used in the treatment of certain viral infections and cancer; it stimulates natural killer cells and enhances the expression of MHC proteins [56–61]. IFNγ is a key cytokine of innate and adaptive immunity against viral and intracellular bacterial infections; it has antiviral, antitumor and immunoregulatory functions [62]. sCD40L is a soluble form of CD40 ligand, predominantly expressed on activated T cells, is required for B cell maturation and development of humoral immunity, and is also involved in regulating dendritic cell function [63, 64]. The observed effect of muramyl peptides complements previously obtained data on the effect of GMDP on dendritic cells [26, 65]. A 70 % increase in sCD40L levels under the action of L-D muramyl peptides also demonstrates the potential of muramyl peptides to influence adaptive immunity. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), which stimulates the production of granulocytes and macrophages from bone marrow progenitor cells and enhances the functional activity of mature leukocytes [66], increased more than twofold to 6 pg/ml under the action of L-D muramyl peptides. The discovered activity of muramyl peptides to stimulate GM-CSF production may explain the effectiveness of a GMDP-based drug in the treatment and development of new therapies for patients with hepatitis [67, 68].

It is noteworthy that L-D muramyl peptides (GMDP, GMDP-OH and GMDP-Lys) increased the production of both proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, indicating the possibility of regulating multidirectional processes depending on the context and microenvironment, which is consistent with the previously discovered ability of GMDP to influence the production of proinflammatory cytokines and modulate the transcription of genes responsible for the manifestation of regulatory functions of immunocompetent cells [65].

It should be taken into account that the cell walls of commensal bacteria include not only muramyl peptides, but also lipopolysaccharides, lipid II, which are also bioregulators of intracellular processes. Commensal microorganisms are not the only source of muramyl peptides. During respiration, bacteria enter the upper respiratory tract along with dust and plant pollen [69–71]. In this case, not only muramyl peptides but also lipopolysaccharides of various structures, which are part of the structure of gram-negative bacteria, lipid II, bacteriocins, as well as pollen antigens and pollutants, have an effect.

On the other hand, endogenous regulators of the macroorganism, such as antimicrobial peptides, hormones, lysozyme, etc., can change the activity of muramyl peptides by enhancing or weakening their effect [72, 73].

Thus, when analyzing the effects of muramyl peptides, it is necessary to take into account their potentiating effect of numerous external factors, as well as factors of the internal environment of the body, for example, the activity of enzymes involved in the phosphorylation of muramyl peptides, without which NOD2 activation is impossible [74]. For a comprehensive analysis and visualization of activation pathways, numerous databases are created using systems biology approaches that reveal the activation of numerous signaling pathways in health and disease [75–78].

## Conclusion

The D-configuration of isoglutamine is fundamental for the implementation of the regulatory activity of muramyl peptides: in human mononuclear cells, glucosaminyl muramyl dipeptide with the L-configuration of isoglutamine does not affect the production of cytokines IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF-a, TNF- $\beta$ , GM-CSF.

Systemic relationships between microorganisms and the macroorganism at the level of mucous membranes, organs and tissues, formed in the process of evolution, are of great importance for maintaining immune homeostasis and underlie the development of methods for the prevention and therapy of socially

significant immune-dependent diseases. At the same time, a comprehensive study of the microbiome, genome, transcriptome, and metabolome in normal and pathological conditions remains relevant, among which the determination of the mechanisms of the influence of bacterial bioregulators, which are fragments of the cell walls of Gram (+) and Gram (–) bacteria, on immune homeostasis is especially important. Further study of compounds of bacterial origin is of interest due to their ability to pass through the epidermis and mucous membranes and thus exert a local and systemic effect on the macroorganism, helping in the fight against pathogens.

A wide range of bacterial bioregulators, the source of which are microorganisms, regulate the host homeostasis and trigger immune reactions, which, depending on the context, can have opposite effects. L-D muramyl peptides activate mononuclear cells, which begin to produce proinflammatory cytokines and chemokines, as well as growth factors necessary for the destruction of pathogens. In addition, anti-inflammatory cytokines are also triggered, which have a regulatory role in the appearance of memory cells and the weakening of inflammatory reactions. Thus, normally, muramyl peptides participate in maintaining tolerance to microflora and maintaining immune homeostasis.

## References

1. Johannsen L. Biological properties of bacterial peptidoglycan. *APMIS*. 1993;101(5):337-44. doi: 10.1111/j.1699-0463.1993.tb00119.x
2. Rohde M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr*. 2019;7:10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018>
3. Adam A, Petit JF, Lefrancier P, Lederer E. Muramyl peptides. Chemical structure, biological activity and mechanism of action. *Mol Cell Biochem*. 1981;41:27-47. doi: 10.1007/BF00225295
4. Williams K. Endotoxin definition and standardization. *Formulation European Pharmaceutical Review*. 2019;2:1-9.
5. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem*. 2002;71:635-700.
6. Matsuura M. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate Gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front. Immunol*. 2013;4:109. doi: 10.3389/fimmu.2013.00109
7. L'vov VL, Gur'yanova SV, Rodionov A.V., Gorshkova R.P. Structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide of

- the lipopolysaccharide of *Yersinia Kristensenii* strain 490 (O:12,25). *Carbohydrate Research*. 1992;228(2):415-422.
8. 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. *Carbohydrate Research*. 1993;241:201-208. doi: 10.1016/0008-6215(93)80106-o
  9. L'vov VL, Gur'ianova SV, Rodionov AV, Dmitriev BA, Shashkov AS, Ignatenko AV, Gorshkova RP, Ovodov IS. The structure of a repetitive unit of the glycerolphosphate-containing O-specific polysaccharide chain from *Yersinia kristensenii* strain 103 (O:12,26) lipopolysaccharide. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1990;16(3):379-389.
  10. Lithgow T, Stubenrauch CJ, Stumpf, MPH. Surveying membrane landscapes: a new look at the bacterial cell surface. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21:502-518. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00862-w>
  11. Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*. 2000;146:249-262. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-2-249>
  12. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1277:54-75 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06813.x>
  13. Park JT, Uehara T. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72:211-227 <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-07>
  14. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol*. 2007;193(3):323-30. doi: 10.1677/JOE-07-0067
  15. Jaén RI, Val-Blasco A, Prieto P, Gil-Fernández M, Smani T, López-Sendón JL, Delgado C, Boscá L, Fernández-Velasco M. Innate Immune Receptors, Key Actors in Cardiovascular Diseases. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(7):735-749. doi: 10.1016/j.jacbts.2020.03.015
  16. Cui J, Chen Y, Wang HY, Wang RF. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3270-85. doi: 10.4161/21645515.2014.979640
  17. Inohara N, Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(5):371-82. doi: 10.1038/nri1086
  18. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005;307(5710):731-4. doi: 10.1126/science
  19. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;314(6837):599-603. doi: 10.1038/35079107
  20. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001;357(9272):1925-8. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05063-7
  21. Bruns T, Peter J, Hagel S, Pfeifer R, Prinz P, Stallmach A. Homozygous carrier of the NOD2 1007fs frame-shift mutation presenting with refractory community-acquired spontaneous bacterial peritonitis and developing fatal pulmonary mucormycosis: A case report. *Hepatol Res*. 2011;41(10):1009-14. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00850.x
  22. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;60(1):197-209. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.044
  23. Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51(4):1327-33. doi: 10.1002/hep.23440
  24. Gurunathan S, Thangaraj P, Kim JH. Postbiotics: Functional Food Materials and Therapeutic Agents for Cancer, Diabetes, and Inflammatory Diseases. *Foods*. 2023;13(1):89. doi: 10.3390/foods13010089
  25. Sizyagina LP, Andreeva II, Petruichik SV. Optimization of Therapy of Patient with Genetic Defect Antibody Production. *RUDN Journal of Medicine*. 2019;23(4):405-411. [Сизякина Л.П., Андреева И.И., Петручик С.В. Оптимизация терапии пациента с генетическим дефектом антителопродукции // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2019. Т. 23. No 4. С. 405-411]. doi: 10.22363/2313-0245-2019-23-4-405-411
  26. 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
  27. Sizyagina LP, Zakurskaya VYa, Guryanova SV. Glucosaminylmuramyl dipeptide efficacy in post-COVID-19 patient rehabilitation treatment. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2023;12 (1):17-25. (in Russian) [Сизякина Л.П., Закурская В.Я., Гурьянова С.В. Эффективность глюкозаминилмурамилдипептида в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2023. Т. 12, № 1. С. 17-25]. doi: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-1-17-25>
  28. Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974;59(4):1317-25. doi: 10.1016/0006-291x(74)90458-6
  29. Chedid L, Parant M, Parant F, Lefrancher P, Choay J, Lederer E. Enhancement of nonspecific immunity to *Klebsiella pneumoniae* infection by a synthetic immunoadjuvant (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) and several analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(5):2089-93. doi: 10.1073/pnas.74.5.2089

30. Khan FA, Khanam R, Qasim MW, Wang Y, Jiang ZH. Improved Synthesis of D-Isoglutamine: Rapid Access to Desmuramyl Analogues of Muramyl Dipeptide for the Activation of Intracellular NOD2 Receptor and Vaccine Adjuvant Applications. *Eur JOC*. 2021;48:6688-6699. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202101170>
31. Johnson AG. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(3):277-89. doi: 10.1128/CMR.7.3.277
32. Kamboj A, Patil MT, Petrovsky N, Salunke DB. Structure-activity relationship in NOD2 agonistic muramyl dipeptides. *Eur J Med Chem*. 2024;271:116439. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116439
33. Britanova OV, Staroverov DB, Chkalina AV, Kotlobay AA, Zvezdova ES, Bochkova AG, Chudakov DM. Single high-dose treatment with glucosaminyl-muramyl dipeptide is ineffective in treating ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*. 2011;31(8):1101-3. doi: 10.1007/s00296-010-1663-3
34. Williamson D, Chawla M, R Marks. GMDP for psoriasis. *The Lancet*. 1998;352(9127):545. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79253-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79253-9)
35. Guryanova SV, Kataeva A. Inflammation Regulation by Bacterial Molecular Patterns. *Biomedicines*. 2023;11(1):183. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010183>
36. Cheng WC, You TY, Teo ZZ, Sayyad AA, Maharana J, Guo CW, Liang PH, Lin CS, Meng FC. Further Insights on Structural Modifications of Muramyl Dipeptides to Study the Human NOD2 Stimulating Activity. *Chem Asian J*. 2020;15(22):3836-3844. doi: 10.1002/asia.202001003
37. Mhamane TB, Sambyal S, Vemireddy S, Paturu RSR, Katragadda SB, Syed S, Khan A, Halmuthur M SK. Design, synthesis and biological evaluation of novel lipophilic 2, 5-disubstituted tetrazole analogues of muramyl dipeptide as NOD2 agonists. *Bioorg Med Chem*. 2023;88-89:117296. doi: 10.1016/j.bmc.2023.117296
38. Reddy PRS, Sambyal S, Mhamane TB, Sravanthi V, Shafi S, Khan IA, Sampath Kumar HM. Synthesis and biological evaluation of novel 2-azido muramyl dipeptide as NOD2 agonistic adjuvants. *Bioorg Med Chem*. 2022;66:116781. doi: 10.1016/j.bmc.2022.116781
39. Chen K, Huang D, Chiu C, Lin WW. Synthesis of Diverse N-Substituted Muramyl Dipeptide Derivatives and Their Use in a Study of Human NOD2 Stimulation Activity. *Chemistry. A European journal*. 2015;21(34):11984-11988. <https://doi.org/10.1002/chem.201501557>
40. Rostovtseva LI, Andronova TM, Malkova VP. Synthesis and antitumor action of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-N-acetylmuramyl-disaccharide unit. *Bioorganic Chemistry*. 1981;7(12):1843-1858. (in Russian) [Ростовцева Л.И., Андроновва Т.М., Малькова В.П. Синтез и противоопухолевое действие гликопептидов, содержащих N-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-N-ацетилмурамил-дисахаридное звено. // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843–1858].
41. Aasen AO, Wang JE. Mediator responses in surgical infections. *Surg Infect*. 2006;7(Suppl 2): S3–4. doi: 10.1089/sur.2006.7.s2
42. Jin H, Li M, Jeong E. A body–brain circuit that regulates body inflammatory responses. *Nature*. 2024;630:695-703. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07469-y>
43. 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>
44. York AG, Skadow MH, Oh J, Qu R, Zhou QD, Hsieh WY, Mowel WK, Brewer JR, Kaffe E, Williams KJ, Kluger Y, Smale ST, Crawford JM, Bensinger SJ, Flavell RA. IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. *Nature*. 2024;627(8004):628-635. doi: 10.1038/s41586-024-07098-5
45. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, Goletti D, Sansone C, Calabrone L, Albini A. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol*. 2023;14:1161067. doi: 10.3389/fimmu.2023.1161067
46. Ethuin F, Delarche C, Gougerot-Pocidallo MA. Regulation of Interleukin 12 p40 and p70 Production by Blood and Alveolar Phagocytes During Severe Sepsis. *Lab Invest*. 2003;83:1353-1360. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000087589.37269.FC>
47. Jeong B, Pahan K. IL-12p40 Monomer: A Potential Player in Macrophage Regulation. *Immuno*. 2024;4(1):77-90. <https://doi.org/10.3390/immuno4010005>
48. Landoni E, Woodcock MG, Barragan G, Casirati G, Cinella V, Stucchi S, Flick LM, Withers TA, Hudson H, Casorati G, Dellabona P, Genovese P, Savoldo B, Metelitsa LS, Dotti G. IL-12 reprograms CAR-expressing natural killer T cells to long-lived Th1-polarized cells with potent antitumor activity. *Nat Commun*. 2024;15(1):89. doi: 10.1038/s41467-023-44310-y
49. 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) [Гурьянова С.В., Козлов И.Г., Мещерякова Е.А., Алексеева Л.Г., Андроновва Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид нормализует баланс Th1/Th2 при атопической бронхиальной астме. Иммунология. 2009. № 5. С. 305–308].
50. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med*. 1994;180(4):1395-403. doi: 10.1084/jem.180.4.1395
51. Skariah N, James OJ, Swamy M. Signalling mechanisms driving homeostatic and inflammatory effects of interleukin-15 on tissue lymphocytes. *Discov Immunol*. 2024;3(1): kyae002. doi: 10.1093/discim/kyae002.
52. Hartana CA, Lancien M, Gao C, Rassadkina Y, Lichterfeld M, Yu XG. IL-15-dependent immune crosstalk between natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 elite controllers. *Cell Rep*. 2023;42(12):113530. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113530
53. Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol*. 2000;68(3):400-4.
54. Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes,

- monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*. 1997;185(9):1595-604. doi: 10.1084/jem.185.9.1595
55. Chantry D, Romagnani P, Raport CJ, Wood CL, Epp A, Romagnani S, Gray PW. Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood*. 1999;94(6):1890-1898.
56. Paul F, Pellegrini S, Uzé G. IFN $\alpha$ 2: The prototypic human alpha interferon. *Gene*. 2015;567(2):132-7. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.087
57. Tomasello E, Pollet E, Vu Manh TP, Uzé G, Dalod M. Harnessing Mechanistic Knowledge on Beneficial Versus Deleterious IFN-I Effects to Design Innovative Immunotherapies Targeting Cytokine Activity to Specific Cell Types. *Front Immunol*. 2014;5:526. doi: 10.3389/fimmu.2014.00526
58. Rizza P, Moretti F, Capone I, Belardelli F. Role of type I interferon in inducing a protective immune response: perspectives for clinical applications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(2):195-201. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.10.002
59. Antonelli G, Scagnolari C, Moschella F, Proietti E. Twenty-five years of type I interferon-based treatment: a critical analysis of its therapeutic use. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(2):121-31. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.12.006
60. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*. 2006;25(3):361-72. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.014
61. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Fu YX, Auh SL. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res*. 2011;71(7):2488-96. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2820
62. Ivashkiv LB. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(9):545-558. doi: 10.1038/s41577-018-0029-z
63. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(21):12367-71. doi: 10.1073/pnas.2032886100
64. Xu, Y., Song, G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci*. 2004;11:426-438. <https://doi.org/10.1007/BF02256091>
65. Guryanova SV, Sigmatalin 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: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-470-48
66. Wicks I, Roberts A. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:37-48. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.161>
67. Manapova ER, Fazylov VKh, Guryanova SV. Cytopenia and their correction in antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Problems of Virology*. 2017;62(4):174-8. (In Russian). [Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита C у пациентов с генотипом 1. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62 (4): 174-8] doi: 10.18821/0507-4088-2017-62-4-174-178
68. 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.
69. Idrose NS, Lodge CJ, Erbas B, Douglass JA, Bui DS, Dharmage SC. A Review of the Respiratory Health Burden Attributable to Short-Term Exposure to Pollen. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(12):7541. doi: 10.3390/ijerph19127541
70. Fussell JC, Kelly FJ. Mechanisms underlying the health effects of desert sand dust. *Environ Int*. 2021;157:106790. doi:10.1016/j.envint.2021.106790
71. Guryanova SV, Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov IV, Bohle B and Ovchinnikova TV. How Do Pollen Allergens Sensitize? *Front. Mol. Biosci*. 2022;9:900533. doi: 10.3389/fmolb.2022.900533
72. Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog*. 2017;13(9): e1006512. doi: 10.1371/journal.ppat.1006512
73. Guryanova SV, Ferberg AS, Sigmatalin I.A. Inflammatory response modulation by epinephrine and norepinephrine. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(3):329-341. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-2-329-341
74. Stafford CA, Gassauer AM, de Oliveira Mann CC, Tanzer MC, Fessler E, Wefers B, Nagl D, Kuut G, Sulek K, Vasilopoulou C, Schwojer SJ, Wiest A, Pfautsch MK, Wurst W, Yabal M, Fröhlich T, Mann M, Gisch N, Jae LT, Hornung V. Phosphorylation of muramyl peptides by NAGK is required for NOD2 activation. *Nature*. 2022;609(7927):590-596. doi: 10.1038/s41586-022-05125-x
75. 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\_270 10црт
76. 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>
77. Namasivayam AA, Morales AF, Lacave AM, Tallam A, Simovic B, Alfaro DG, Bobbili DR, Martin F, Androsova G, Shvydchenko I, Park J, Calvo JV, Hoeng J, Peitsch MC, Racero MG, Biryukov M, Talikka M, Pérez MB, Rohatgi N, Díaz-Díaz N, Mandarapu R, Ruiz RA, Davidyan S, Narayanasamy S, Boué S, Guryanova S, Arbas SM, Menon S, Xiang Y. Community-Reviewed Biological Network Models for Toxicology and Drug Discovery Applications. *Gene Regul Syst Bio*. 2016;10:51-66. doi: 10.4137/GRSB.S39076.
78. Yi M, Li T, Niu M, Zhang H, Wu Y, Wu K, Dai Z. Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):176. doi: 10.1038/s41392-024-01868-3

# Влияние мурамилпептидов на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов

С.В. Гурьянова<sup>1,2</sup>  

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

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, г. Москва, Российская Федерация  
 [svgur@mail.ru](mailto:svgur@mail.ru)

**Аннотация.** *Актуальность.* Рост воспалительных, аллергических и инфекционных заболеваний, наблюдающийся в последнее время, актуализирует задачу поиска новых способов повышения неспецифической резистентности организма. Врожденный иммунитет обеспечивают первую линию защиты от патогенов через активацию рецепторов, определяющих микроорганизмы посредством рецепторов TLRs, NLRs и CLR. Мурамилпептиды, образующие клеточную стенку всех известных бактерий, распознаются NLRs и запускают реакции иммунной системы по элиминации патогенов. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния мурамилпептидов на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками. *Материалы и методы.* Мононуклеарные клетки получали из периферической крови здоровых добровольцев с помощью реагента Cell Separation Media Lympholyte CL 5015 и культивировали 4 часа в присутствии глюкозаминил мурамил дипептидов ГМДП, ГМДП-ОН, ГМДП-Lys, ГМДП-LL; в контрольные лунки добавляли адекватное количество среды. Уровни хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов измеряли с помощью магнитных шариков с антителами согласно инструкции производителя Luminex 200, Merck (Millipore) equipment, and software (Burlington, Massachusetts, USA). *Результаты и обсуждение.* Установлено, что мурамилпептиды GMDP, GMDP-ON, GMDP-Lys и усиливают продукцию цитокинов IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF-a, TNF- $\beta$ , GM-CSF. GMDP-LL не влияет на продукцию цитокинов. В то же время мурамилпептиды с L-конфигурацией аланина и D-конфигурацией изоглутамина (L-D-мурамилпептиды) не изменили значения IL-2, IL-3, IL-5, IL-9. *Выводы.* D-конфигурация изоглутамина является необходимой для реализации регуляторной активности мурамилпептидов. Широкий спектр бактериальных биорегуляторов, источником которых являются микроорганизмы, регулируют гомеостаз хозяина и запускают иммунные реакции, которые в зависимости от контекста могут иметь противоположные эффекты. L-D-мурамилпептиды активируют мононуклеарные клетки, которые начинают продуцировать провоспалительные цитокины и хемокины, а также факторы роста, необходимые для уничтожения патогенов. Кроме того, запускаются и противовоспалительные цитокины и хемокины, которые играют регуляторную роль в появлении клеток памяти и ослаблении воспалительных реакций. Таким образом, в норме мурамилпептиды участвуют в поддержании толерантности к микрофлоре и поддержании иммунного гомеостаза.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, иммунный гомеостаз, толерантность, глюкозаминилмурамилдипептид, мурамилпептид, регуляция воспаления, бактериальные биорегуляторы, NOD2

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

**Вклад авторов:** С.В. Гурьянова — разработка дизайна исследования, проведение исследования, написание рукописи.

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

**Этическое утверждение.** Исследование проведено в соответствии со стандартами Хельсинской декларации (Declaration Helsinki, 2013). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом медицинского института Российского университета дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация.

**Благодарности** — неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию.** Все участники добровольно дали согласие на обработку персональных данных и участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации  
Поступила 07.12.2023. Принята 15.01.2024.

**Для цитирования:** *Guryanova S.V.* Influence of muramyl peptides on the production of chemokines, growth factors, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 365–376. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-365-376. EDN: DJROAN.

*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-Maklayay, 16/10, Moscow, Russian Federation. E-mail: [svgur@mail.ru](mailto:svgur@mail.ru)  
Guryanova S.V. ORCID 0000-0001-6186-2462

*Ответственный за переписку:* Гурьянова Светлана Владимировна — кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и общей генетики медицинского института Российского университета дружбы народов, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: [svgur@mail.ru](mailto:svgur@mail.ru)  
Гурьянова С.В. SPIN 6722-8695; ORCID 0000-0001-6186-2462



## DERMATOLOGY ДЕРМАТОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-377-381  
EDN: ANGFNA

CLINICAL CASE  
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

### Topical timolol maleate in the treatment of mixed and deep infantile hemangiomas: a report of two cases

Pavlovic Momcilo<sup>1</sup>  , Rokvic Zeljko<sup>2</sup>, Ilic Tatjana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Children's Ambulatory Care Center, Subotica, Serbia

<sup>2</sup> General Hospital Subotica, Subotica, Serbia

 pavlovic.vsovsu@gmail.com

**Abstract.** *Relevance.* Infantile hemangiomas are the most prevalent vascular tumors in children. Since the natural progression of infantile hemangiomas is typically benign, over 90 % of cases do not require medical intervention. However, treatment is necessary for infantile hemangiomas that present local complications, functional impairments, or a risk of disfigurement. In this article we presented two children with mixed and deep infantile hemangiomas, with satisfactory therapeutic responses after treatment with topical timolol maleate. *Conclusion.* Timolol maleate is an effective, well-tolerated, and safe treatment option for various types of infantile hemangiomas.

**Keywords:** hemangioma, timolol, propranolol, topical, treatment

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

**Author contributions:** Pavlovic Momcilo observed and treated the patients and drafted the manuscript. Rokvic Zeljko performed the ultrasounds and critically revised the manuscript. Ilic Tatjana critically revised the manuscript and provided supervision. 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.

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

© Pavlovic M., Rokvic Z., Ilic T., 2024



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

**Ethics approval:** According to local ethical guidelines, ethical approval is not required for case reports.

**Acknowledgements:** We extend our special thanks to Dr. Karolina Berenji and Dr. Bogdan Arsic for their constructive criticism.

**Consent for publication:** All parents provided informed voluntary consent for their children to participate in the study, in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), and consented to the processing of personal data.

Received 07.06.2024. Accepted 09.07.2024.

**For citation:** Pavlovic M, Rokvic Z, Ilic T. Topical timolol maleate in the treatment of mixed and deep infantile hemangiomas: a report of two cases. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;27(3):377–381. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-377-381. EDN: ANGFNA.

## Introduction

Infantile hemangiomas (IHs) are vascular neoplasms and the most common soft tissue tumors of infancy, characterized by aberrant blood vessel architecture and abnormal proliferation of endothelial cells, occurring in about 5 % of infants [1]. Most IHs do not require treatment, but 5–10 % of patients with IHs require some form of intervention. Although there is no algorithm to determine the most appropriate intervention for IHs, treatment should be individualized based on the patient's age, the size and growth phase of the lesions, morphology, location, the presence or possibility of complications, and the urgency of intervention [1, 2].

We present the therapeutic effects observed in two infants with a single cutaneous IHs, who were treated with topical timolol maleate. Timolol maleate, in the form of a 0.5 % gel, was applied twice daily directly to the IHs, while avoiding the surrounding skin. We evaluated the effectiveness of timolol therapy using the Hemangioma Activity Score (HAS) before treatment initiation and again after 6–7 months [3]. The photographs were taken at different points in time, before as well as during the usage of topical timolol therapy.

## Clinical report

**Patient 1.** The 3-month-old girl had a mixed IH on her right upper eyelid, causing blepharoptosis and almost covering her pupil. The IH was oval, measuring 17×10 mm in diameter. It was reddish-purple in color and elevated about 2 mm above the surrounding skin at its central part, with a HAS score of 9 (Figure 1).



**Fig. 1.** Mixed infantile hemangioma on the right upper eyelid before topical timolol therapy

The infant's parents were concerned about the IH, worrying about its enlargement and potential adverse medical and aesthetic effects. We treated the IH for six months with topical timolol maleate, advising additional eye protection. After that period, the treated IH was flattened almost to the level of the surrounding skin, and its surface was similar in color to the surrounding area (HAS score 2) (Figure 2).



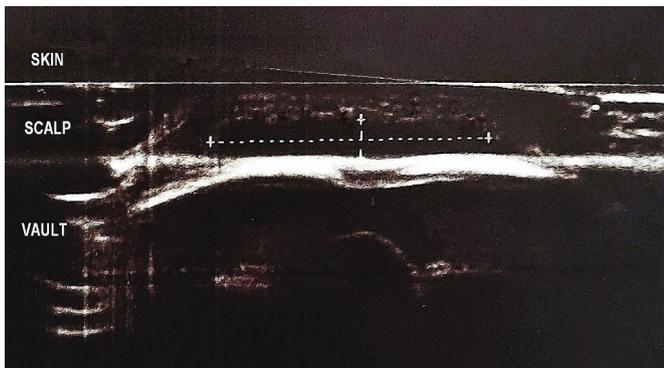
**Fig. 2.** Infantile hemangioma on right upper eyelid after six months of usage of topical timolol therapy

**Patient 2.** The 2.5-month-old boy had a deep IH at the top of his head, on the left side of the sagittal suture, with no evident surface changes (Figure 3).



**Fig. 3.** Deep infantile hemangioma at the top of the head before timolol therapy

It had a regular ovoid shape, measured ultrasonographically at 23×19×3.7 mm, above the surrounding skin, and its HAS score was assessed at 6 (Figure 4).



**Fig. 4.** A well-defined, deep, ovoid lesion which measures 23 x 19 x 3.7 mm is seen in the subcutaneous plane

After seven months of local therapy with 0.5% timolol maleate gel, the IH completely disappeared, the skin color was normal, and the HAS score dropped to 0 (Figure 5).



**Fig. 5.** Infantile hemangioma at the top of the head after seven months of topical timolol therapy

## Discussion

There are many modalities of therapy for IHs, including non-selective  $\beta$ -blockers (propranolol and topical timolol), corticosteroids, interferon- $\alpha$ , imiquimod, anti-angiogenic agents, physical measures (laser surgery, cryosurgery), and surgical interventions in select patients [1].

Currently, beta-blockers are considered the first-line therapy for different types of IHs, with other treatment options becoming less necessary after this discovery. The mechanism of action involves several pathways contributing to the regression of these vascular tumors. These pathways induce vasoconstriction of blood vessels and reduce nitric oxide release, block proangiogenic signals, prevent the secretion of proteases necessary for reorganization into functional vessels (angiogenesis), and induce apoptosis [4].

Due to propranolol affecting the cellular physiology of IHs endothelial cells across the vessels, while topical timolol maleate interacts with hemangioma pericytes circumscribing the vessels, Wu HW et al. hypothesized that local timolol maleate and systemic propranolol might exert their effects partly by targeting different cells [5]. The same authors compared the efficacy and safety of propranolol and topical timolol maleate, concluding that topical timolol is at least as effective as oral propranolol for the treatment of superficial IHs, with success rates of 97% and 96.4%, respectively. Püttgen et al. conducted a multicenter retrospective cohort study involving 731 patients who were treated with timolol maleate for IHs. The study found that only 7.3% of these patients required subsequent therapy with systemic  $\beta$ -blockers [6].

Adverse effects are more frequently observed with systemic beta-blockers compared to topical application. Oral propranolol in the pediatric population can lead to sleep disorders, somnolence, agitation, hypotension, bradycardia, pulmonary symptoms, hypoglycemia, and gastrointestinal symptoms [7].

Timolol maleate is a relatively new therapy for IHs with no statistically significant side effects, although some studies have raised concerns about systemic absorption and potential side effects such as sleep disturbances [2]. Chakkittakandiyl et al. performed

a retrospective, multicenter study, including 73 children with IHs [8]. Only one patient experienced systemic side effects (sleep disturbance). We did not observe any side effects in our two patients.

A 2018 Cochrane review, comprising 28 randomized controlled trials and 1,728 patients, compared various treatments for IHs. The authors concluded that topical timolol maleate was as effective as oral propranolol based on one study involving 26 participants (very low-quality evidence) [9].

Consensus statements from the Australasian Vascular Anomalies Network and the Australasian Paediatric Dermatology Network, as well as the American Academy of Pediatrics, British Society for Pediatric Dermatology, and European expert group, all recommend oral propranolol as the treatment of choice for IHs [1, 10–12]. However, except for the British Society for Pediatric Dermatology, these consensus guidelines also include topical timolol maleate as a possible early treatment option only for small and superficial IHs. This recommendation is based on evidence rated as not high-quality and mainly derived from a small number of patients. Both the American Academy of Pediatrics and European expert groups mention topical timolol maleate, noting that only one randomized controlled trial has compared it to a placebo.

## Conclusion

In conclusion, current consensus guidelines justify the application of topical timolol maleate as an effective treatment for small and superficial IHs. Furthermore, our findings suggest that timolol maleate may also be an effective and safe treatment option for reducing the volume of not only superficial IHs but also deep or mixed IHs in the outpatient setting.

## References/Библиографический список

1. Krowchuk DP, Frieden IJ, Mancini AJ, Darrow DH, Blei F, Greene AK, Annam A, Baker CN, Frommelt PC, Hodak A, Pate BM, Pelletier JL, Sandrock D, Weinberg ST, Whelan MA. Subcommittee on the Management of Infantile Hemangiomas. Clinical Practice Guideline for the Management of Infantile Hemangiomas. *Pediatrics*. 2019;143(1): e20183475. doi: 10.1542/peds.2018-3475
2. Darrow DH, Greene AK, Mancini AJ, Nopper AJ. Section on Dermatology, Section on Otolaryngology–head and Neck Surgery, and Section on Plastic Surgery. Diagnosis and Management of Infantile Hemangioma. *Pediatrics*. 2015;136(4): e1060-104. doi: 10.1542/peds.2015-2485
3. Janmohamed SR, de Waard-van der Spek FB, Madern GC, de Laat PC, Hop WC, Oranje AP. Scoring the Proliferative Activity of Haemangioma of Infancy: the Haemangioma Activity Score (HAS). *Clin Exp Dermatol*. 2011;36:715-723. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04080.x
4. Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for Infantile Haemangiomas: Insights into the Molecular Mechanisms of Action. *Br J Dermatol*. 2010;163:269-74. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09848.x
5. Wu HW, Wang X, Zhang L, Zheng JW, Liu C, Wang YA. Topical Timolol vs. Oral Propranolol for the Treatment of Superficial Infantile Hemangiomas. *Front Oncol*. 2018;8:605. doi: 10.3389/fonc.2018.00605
6. Püttgen K, Lucky A, Adams D, Pope E, McCuaig C, Powell J, Feigenbaum D, Savva Y, Baselga E, Holland K, Drolet B, Siegel D, Morel KD, Garzon MC, Mathes E, Lauren C, Nopper A, Horii K, Newell B, Song W, Frieden I. Hemangioma Investigator Group. Topical Timolol Maleate Treatment of Infantile Hemangiomas. *Pediatrics*. 2016;138(3): e20160355. doi: 10.1542/peds.2016-0355
7. Giese RA, Turner M, Cleves M, et al. Propranolol for Treatment of Infantile Hemangioma: Efficacy and Effect on Pediatric Growth and Development. *Int J Pediatr*. 2021;2021:6669383. doi: 10.1155/2021/6669383
8. Chakkittakandiyil A, Phillips R, Frieden IJ, Siegfried E, Lara-Corrales I, Lam J, Bergmann J, Bekhor P, Poorsattar S, Pope E. Timolol Maleate 0.5% or 0.1% Gel-Forming Solution for Infantile Hemangiomas: a Retrospective, Multicenter, Cohort Study. *Pediatr Dermatol*. 2012;29(1):28-31. doi: 10.1111/j.1525-1470.2011.01664.x
9. Novoa M, Baselga E, Beltran S, Giraldo L, Shahbaz A, Pardo-Hernandez H, Arevalo-Rodriguez I. Interventions for Infantile Haemangiomas of the Skin. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;4(4): CD006545. doi: 10.1002/14651858.CD006545.pub3
10. Smithson SL, Rademaker M, Adams S, Bade S, Bekhor P, Davidson S, Dore A, Drummond C, Fischer G, Gin A, Grills C, Halbert A, Lokmic Z, McCahon E, Morgan VA, Murrell DF, Orchard D, Penington A, Purvis D, Relic J, Robertson S, Robinson AJ, Scardamaglia L, Su J, Tan S, Wargon O, Warren L, Wong LC, Zappala T, Phillips R. Consensus Statement for the Treatment of Infantile Haemangiomas with Propranolol. *Australas J Dermatol*. 2017;58(2):155-159. doi: 10.1111/ajd.12600
11. Solman L, Glover M, Beattie PE, Buckley H, Clark S, Gach JE, Giardini A, Helbling I, Hewitt RJ, Laguda B, Langan SM, Martinez AE, Murphy R, Proudfoot L, Ravenscroft J, Shahidullah H, Shaw L, Syed SB, Wells L, Flohr C. Oral Propranolol in the Treatment of Proliferating Infantile Haemangiomas: British Society for Paediatric Dermatology Consensus Guidelines. *Br J Dermatol*. 2018;179:582-9. doi: 10.1111/bjd.16779
12. Hoeger PH, Harper JJ, Baselga E, Bonnet D, Boon LM, Ciofi Degli Atti M, El Hachem M, Oranje AP, Rubin AT, Weibel L, Léauté-Labrèze C. Treatment of Infantile Haemangiomas: Recommendations of a European Expert Group. *Eu. J Pediatr*. 2015; 174: 855-65. doi: 10.1007/s00431-015-2570-0

## Местное применение тимолола малеата в лечении смешанных и глубоких младенческих гемангиом: сообщение о двух случаях

М. Павлович<sup>1</sup>  , Ж. Роквич<sup>2</sup>, Т. Илич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Детский амбулаторный центр, г. Суботица, Сербия

<sup>2</sup>Главная больница Суботицы, г. Суботица, Сербия

 pavlovic.vsovsu@gmail.com

**Аннотация.** *Актуальность.* Инфантильные гемангиомы являются наиболее распространенными сосудистыми опухолями у детей. Поскольку естественное развитие инфантильных гемангиом обычно доброкачественное, более 90 % случаев не требуют медицинского вмешательства. Однако лечение необходимо для инфантильных гемангиом, которые представляют местные осложнения, функциональные нарушения или риск обезображивания. Мы представили двух детей со смешанными и глубокими инфантильными гемангиомами с удовлетворительными терапевтическими ответами после лечения топическим тимололом малеатом. Выводы. Тимолол малеат является эффективным, хорошо переносимым и безопасным вариантом лечения различных типов инфантильных гемангиом.

**Ключевые слова:** гемангиома, тимолол, пропранолол, местный, лечение

**Информация о финансировании.** Авторы не получали финансовой поддержки для исследования, авторства или публикации этой статьи.

**Вклад авторов.** Павлович Момчило наблюдал и лечил пациентов и составил рукопись. Роквич Желько провел УЗИ и критически отредактировал рукопись. Илич Татьяна критически отредактировала рукопись и обеспечила руководство. Все авторы внесли значительный вклад в концепцию, проведение исследования и подготовку статьи, а также прочитали и одобрили окончательную версию перед публикацией.

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

**Этическое утверждение.** Согласно местным этическим рекомендациям для отчетов о случаях не требуется одобрение этики.

**Благодарности.** Мы выражаем особую благодарность доктору Каролине Беренджи и доктору Богдану Арсичу за их конструктивную критику.

**Информационное согласие на публикацию.** Все родители предоставили информированное добровольное согласие на участие своих детей в исследовании в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация ВМА — Этические принципы медицинских исследований с участием людей, 2013 г.) и дали согласие на обработку персональных данных.

Поступила 07.06.2024. Принята 09.07.2024.

**Для цитирования:** Павлович М., Роквич Ж., Илич Т. Местное применение тимолола малеата в лечении смешанных и глубоких младенческих гемангиом: сообщение о двух случаях // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 27. № 3. С. 377–381. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-377-381. EDN: ANGFNA.

*Corresponding author:* Pavlovic Momcilo — MD, PhD, Pediatrician, Gastroenterologist, Head of the institution Children's Ambulatory Care Center, Subotica, 24000, Solohova, 18, Subotica, Serbia. E-mail: pavlovic.vsovsu@gmail.com  
Pavlovic M. ORCID 0000-0001-7818-3140

*Ответственный за переписку:* Павлович Момчило — доктор медицинских наук, педиатр, гастроэнтеролог, руководитель учреждения Детский амбулаторный центр, Сербия, 24000, г. Суботица, ул. Солохова, д. 18. E-mail: pavlovic.vsovsu@gmail.com  
Павлович М. ORCID 0000-0001-7818-3140



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-382-389

EDN: EUGQPP

CLINICAL CASE  
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

## Monomorphic type clinical features of maculo-papular cutaneous mastocytosis

Elena I. Kasikhina<sup>1,2</sup>  , Ahmed Yasser Nada<sup>2</sup> , Maria N. Ostretsova<sup>2</sup> ,  
Olga V. Zhukova<sup>1,2</sup> , Mikhail A. Kochetkov<sup>1</sup> , R.A. Khanferyan<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>RUDN University, Moscow, Russian Federation

 [kasprof@bk.ru](mailto:kasprof@bk.ru)

**Abstract. Relevance.** A monomorphic type of maculo-papular cutaneous mastocytosis was allocated relatively recently. In children and adolescents with a monomorphic type of MPCM (adult type pattern), clinical manifestations persist into adulthood and can transform into a systemic process, which determines the need for regular monitoring of this category of patients. *The aim* was to analyse the results of clinical, laboratory and instrumental examinations of an adolescent with a monomorphic type of MPCM. *Materials and Methods.* The study of an adolescent patient included data of laboratory examination, pathomorphological examination, ultrasound examination of the abdominal organs and cKIT gene of an adolescent with a monomorphic type of MPCM, observed at “Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology”. *Results and Discussion.* The process was represented by multiple rashes on the skin of the trunk and limbs. Darier’s sign is positive. The patient’s serum tryptase level exceeded the age norm. The late onset (at the age of 12) of the disease, elevated tryptase levels, neurological symptoms, and the risk of anaphylaxis caused alertness regarding the development of the systemic form, therefore an ultrasound examination of the abdominal organs was performed and the presence of a mutation in the cKIT gene in peripheral blood was determined. *Conclusion.* Clinical report of an adolescent patient in Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology was presented. Thus, the combination of clinical and laboratory data allows minimizing the number of invasive procedures in children with CM. Assessment of the tryptase level, mutation detection in the cKIT gene and ultrasound examination of abdominal organs can be useful for timely diagnosis of systemic mastocytosis, which allows to carry out the necessary correction of the disease status and drug therapy.

**Keywords:** maculo-papular cutaneous mastocytosis, monomorphic type, children, adolescents, diagnostics

**Funding.** This study was not supported by any external sources of funding.

© Kasikhina E.I., Nada A.Y., Ostretsova M.N., Zhukova O.V., Kochetkov M.A., Khanferyan R.A., 2024



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

**Author contributions.** E.I. Kasikhina, A. Ya. Nada, O.V. Zhukova — concept, research planning, data collection and systematization, text writing. M.A. Kochetkov — photo documentation and dermatoscopy, description of the research results. M.N. Ostretsova, R.A. Khanferyan — writing and 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.** Authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval.** The study was approved by the bioethics commission of Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenerology and Cosmetology (Protocol № 28, 21.03.2022).

**Acknowledgements** — not applicable.

**Consent for publication.** Informed consent form clearly explaining the study procedures, risks, and code of conduct in cases of any emergencies, was given to participant. The information consent was signed by the patient's mother. Personal information of participant was kept confidential and was only fairly used in the study.

Received 24.02.2024 Accepted 12.04.2024.

**For citation:** Kasikhina EI, Nada AY, Ostretsova MN, Zhukova OV, Kochetkov MA, Khanferyan RA. Monomorphic type clinical features of maculo-papular cutaneous mastocytosis. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;27(3):382–389. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-382-389. EDN: EUGQPP.

## Introduction

Mastocytosis is a heterogeneous group of diseases characterized by the accumulation of neoplastic mast cells (MC) in one or more organs. Mostly, mastocytosis develops due to an acquired activating mutation in the KIT protein, which leads to an increased proliferation and survival of MC in tissues [1]. In children, the disease is usually limited to the skin, but sluggish systemic mastocytosis may develop. The most common form of cutaneous mastocytosis (CM) is maculo-papular cutaneous mastocytosis (MPCM) [2, 3]. The World Health Organization (WHO) identifies two main forms of maculo-papular cutaneous mastocytosis (MPCM): monomorphic and polymorphic. The monomorphic type, which is more common in adults, but can also be observed in children, is manifested by small, round, mostly flat, brown or red spotted (maculo-papular) rashes, which usually have a central symmetrical distribution over the body and are classically absent on the skin of the central part of the face, palms and soles [4, 5].

Variants of the course of MPCM have a predictive value. In patients with polymorphic type of MPCM, rashes tend to have regular spontaneous regression during puberty. In children and adolescents with a monomorphic

type of MPCM (adult type pattern), clinical manifestations continue to persist into adulthood [5, 6]. Patients with a monomorphic type of skin lesions have been identified as a risk group for developing systemic mastocytosis since 2016 [7]. Several studies demonstrated that mastocytosis, with a debut in early childhood and large maculopapular skin rashes (polymorphic type of MPCM), is associated with lower serum tryptase levels, favourable outcome and relatively more frequent spontaneous remission [6–8]. Dynamic observation of children with mastocytosis in studies of the last decade has shown that systemic mastocytosis (SM) is diagnosed in children more often than at the beginning of the XXI century [3, 7, 9–10]. This is due to the progress made over the past few years in diagnostic studies, particularly, in the identification and quantitative evaluation of the KIT D816V mutation [11].

When diagnosing CM, data from the results of pathomorphological and immunohistochemical studies are taken into account [12]. In patients with CM, the average amount of MC in the affected dermis is about 3–8 times more than in the dermis of healthy people (about 40 MC/mm<sup>2</sup>), and about 2–3 times more than in those suffering from inflammatory skin diseases [2]. Recently, the use of sensitive, allele-specific quantitative polymerase chain analysis (ASq-PCR) KIT D816V for the study of mutations in blood serum

has become a standard screening examination in adults with manifestations of CM and persons with suspected mastocytosis without skin signs and symptoms [13, 14]. Carter et al. (2018) showed that the detection of KIT D816V in peripheral blood in combination with organomegaly, allows to identify a risk group of children with a high probability of developing a systematic process [7]. Thus, a comprehensive examination of patients with mastocytosis is necessary to determine the tactics of management and further prognosis of the course of the disease.

In available domestic literature, we have not found publications devoted to the description of clinical cases with the analysis of clinical, laboratory and instrumental studies in monomorphic type of maculo-papular cutaneous mastocytosis in children and adolescents.

### Clinical report

Patient A., born in 2005 was under our supervision in Moscow scientific and practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology. A mother with her 17 years old son addressed the clinic with their complaints of multiple rashes on the skin of the trunk and limbs in April 2023 for the first time. The rashes became brighter during temperature changes, and during physical and emotional stress. Occasionally, the teenager was disturbed by moderate itching of the skin. He also noted the feeling of rapid fatigue with physical and mental workload, in addition to frequent headaches.

The patient indicated that the onset of the disease occurred at the age of 12, when rashes appeared on the skin of the back. Gradually, the number of rashes on the skin of the trunk increased. Also, from the age of 12, the patient is worried about recurrent stomatitis, headaches with nausea but without vomiting, abdominal pain, and diarrhoea. At school, there were episodes of fainting during exams period. 5 years prior to the referral to Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, the diagnosis of mastocytosis was not established. The pigmented form of lichen planus, teardrop-shaped and lichenoid chronic pityriasis were assumed to be the possible diagnoses. No treatment was carried out.

The following is known from the anamnesis of life. Neuropsychiatric development is age-appropriate. Vaccination according to the National Calendar of Preventive Vaccinations. Past illnesses: acute respiratory viral infections, chickenpox. In 2022 — concussion of the brain. There were no operations. Taking ibuprofen induces hyperaemia of the skin and redness of rashes. He denies allergic reactions to food. Heredity for skin diseases is not burdened. His father has bronchial asthma.

Local status: the pathological skin process is represented by multiple small non-inflammatory spots of light and dark brown colour. All rashes have the same diameter — 0.4–0.5 cm. The rashes are localized symmetrically on the skin in the shoulders, trunk, hips and shins area, with a greater density in the back area (Fig. 1, 2). The spots aren't elevated above the skin surface.



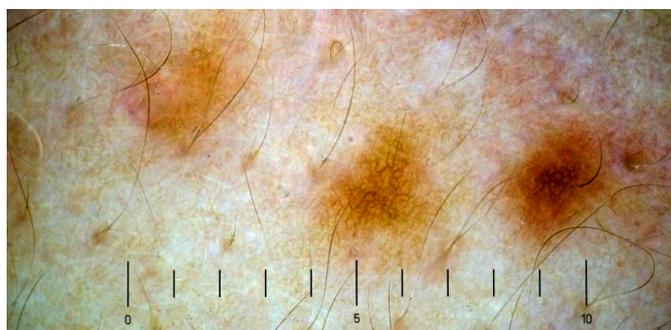
Fig. 1. Monomorphic type of MPCM. Rashes in the back area



**Fig. 2.** Monomorphic type of MPCM. Rashes on the skin of the lower extremities

Darier's sign is positive with the formation of persistent hyperaemia and a blister. Visible mucous membranes, hair, nail plates on the hands and feet are not affected. Peripheral lymph nodes are not enlarged. Persistently red and urticarial dermatographism.

Dermatoscopic examination of monomorphic rashes in spotted elements shows an increase in yellow-brown colour, maintenance of skin appendages, unchanged vellus hair shafts, pseudo-pigmentary network, a weakly pronounced vascular pattern of an asymmetric nature, moderate erythema in surrounding areas (Fig. 3).



**Fig. 3.** Dermatoscopic picture of rashes of monomorphic type MPCM

The SCORMA index was 36 points. When assessing the skin process on a paediatric scale, the 2nd degree of severity was determined (moderate symptoms controlled by antimediator drugs). Systemic risk assessment on the scale of REMA SCORE = 4 (SCORE $\geq$ 2 — high risk of clonal mastocytosis).

### Laboratory and instrumental studies

Clinical blood test dated 04.27.23: erythrocytes —  $5.6 \times 10^{12}$  g/l (norm 4–5,3 $\times 10^{12}$  g/l), haematocrit — 47.8% (norm 35–47%), haemoglobin — 163 g/l (norm 130–160 g/l). The remaining indicators are within the age norm.

Biochemical blood test dated 04.26.23: glucose — 5.94 mmol/l (norm 3.5–6.1 mmol/L), ALAT — 11.9 U/l (norm 0–41 units/l), ACT — 18.3 U/l (norm 0–40 units/l), alkaline phosphatase — 68 U/l (norm 40–130 U/l), total bilirubin — 11.4 mmol/l (norm 3.4–18.8 mmol/l). All indicators are within the age norm.

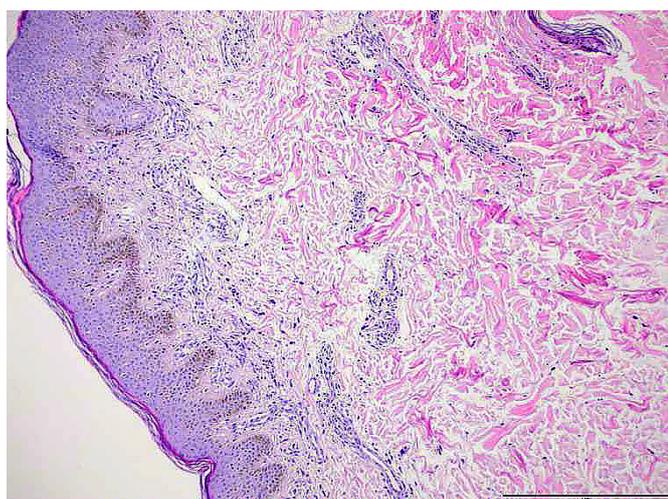
Tryptase (ImmunoCAP) dated 06.27.2023: 12.7 mcg/l (norm < 11.0).

cKIT gene mutation detection in blood serum dated 06.27.23: mutation was not detected.

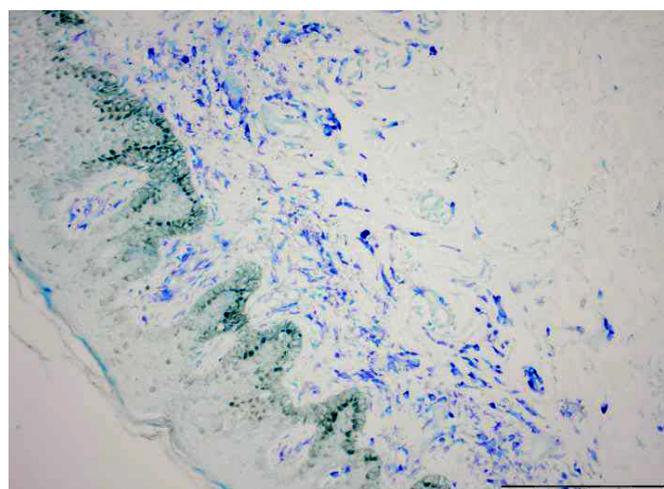
Ultrasound examination of abdominal organs dated 06.21.2013: echographic signs of dyscholia, gallbladder deformity, hepatomegaly due to the left lobe.

### Histological examination

Histological examination of skin biopsy material dated 01.06.23 (Fig. 4): a fragment of skin without subcutaneous fat. The epidermis is slightly thickened, its layers are differentiated, pigmentation of keratinocytes of the basal layer of the epidermis shows no signs of pigment loss. There is moderate lymphomonocytic infiltration around the vessels of the superficial plexus, in which, with additional coloration with toluidine blue, a significant admixture of tissue mast cells is determined (Fig. 5). Collagen fibers without signs of structural changes. In the reticular layer of the dermis there are fragments of adnexal structures of the usual histological structure.



**Fig. 4.** A fragment of skin without subcutaneous fat. Hematoxylin-eosin staining, magnification  $\times 200$



**Fig. 5.** A fragment of skin without subcutaneous fat. Toluidine blue staining, magnification  $\times 200$

**Conclusion:** within the biopsy, pathological changes correspond to mastocytosis.

Consultation of a neurologist dated 04.07.23: vegetative vascular dystonia according to vagotonic type. Multiple syncope. Sleep disturbance. Anxiety.

## Discussion

Managing children with cutaneous mastocytosis is a difficult task for a doctor. The variability of the clinical picture often leads to an erroneous interpretation of rashes with mastocytosis or ignoring these elements,

especially considering the rarity of the pathology. There is evidence that the average time between the onset of the disease and the final diagnosis with subsequent initiation of treatment is 7 years [15]. In the clinical case presented by us, the diagnosis of mastocytosis was made 5 years after the appearance of the first rashes.

The presence of concomitant extracutaneous manifestations such as loss of consciousness and hypotension, headache accompanied by nausea, abdominal pain, diarrhoea attacks, rapid fatigue with physical and mental exertion became an obstacle for the prescription of the necessary antimediatory therapy. Analysis of anamnestic data, interpretation of primary morphological elements with the Darier-Unna phenomenon, dermatoscopic and pathomorphological examination allowed us to form a correct clinical diagnosis.

There is a well-established opinion that in children, the manifestations of CM disappear before or during puberty. In the last twenty years, this theory has been refuted by clinical studies. It has been shown that if the disease persists after adolescence, then in about 10% of cases there is a transformation into a systemic process [16, 17].

In the patient we observed, a late debut (at 12 years old), the presence of extra-cutaneous symptoms of the disease, episodes of anaphylaxis, an elevated level of tryptase caused alertness regarding the development of a systemic form, thus, ultrasound examination of the abdominal organs was performed and the presence of a mutation in the cKIT gene in peripheral blood was determined.

Despite the absence of mutations in the cKIT gene, further dynamic monitoring of the patient should be continued. Prescription of antimediatory therapy is mandatory for elevated levels of tryptase and the presence of itching.

Thus, the combination of clinical and laboratory data allows minimizing the number of invasive procedures in children with CM. Assessment of the tryptase level, determination of mutations in the cKIT gene and ultrasound examination of abdominal organs can be useful for timely diagnosis of systemic mastocytosis, which allows correction of the disease status and drug therapy.

## Conclusion

Cutaneous and systemic forms of mastocytosis are a serious interdisciplinary problem. Numerous symptoms associated with degranulation of MC, such as flushing, anaphylaxis, abdominal cramps, diarrhoea, vomiting, runny nose, aggressive behaviour, anxiety, and others, in practice are extremely rarely associated by clinicians with mastocytosis. The situation is complicated by the lack of Russian clinical guidelines for the treatment and follow-up of patients. The lack of response of rashes to antimediation therapy significantly reduces the quality of life and socialization of children and adolescents suffering from mastocytosis. Therefore, a timely correct analysis of the anamnesis and clinical picture in combination with a dynamic assessment of laboratory and instrumental studies is important for the development of dynamic monitoring and treatment of patients with CM.

## References/Библиографический список

1. Nemat K, Abraham S. Cutaneous mastocytosis in childhood. *Allergologie Select*. 2022;5(6):1-10. doi: 10.5414/ALX02304E
2. Hartmann K, Escribano L, Grattan C, Brockow K, Carter MC, Alvarez-Twose I. Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(1):35-45. doi:10.1016/j.jaci.2015.08.034
3. Méni C, Bruneau J, Georgin-Lavialle S, Le Saché de Peuffeilhoux L, Damaj G, Hadj-Rabia S. Paediatric mastocytosis: a systematic review of 1747 cases. *Br J Dermatol*. 2015;172(3):642-651. doi: 10.1111/bjd.13567
4. Schaffer JV. Pediatric Mastocytosis: Recognition and Management. *Am J Clin Dermatol*. 2021;22(2):205-220. doi: 10.1007/s40257-020-00581-5
5. Matito A, Azaña JM, Torrelo A, Alvarez-Twose I. Cutaneous Mastocytosis in Adults and Children: New Classification and Prognostic Factors. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018;38(3):351-363. doi: 10.1016/j.iac.2018.04.001
6. Wiechers T, Rabenhorst A, Schick T, Preussner LM, Förster A, Valent P, Horny HP, Sotlar K, Hartmann K. Large maculopapular cutaneous lesions are associated with favorable outcome in childhood-onset mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1581-1590. e3. doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.034
7. Carter MC, Clayton ST, Komarow HD, Brittain EH, Scott LM, Cantave D, Gaskins DM, Maric I, Metcalfe DD. Assessment of clinical findings, tryptase levels, and bone marrow histopathology in the management of pediatric mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1673-1679.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.024
8. Kasikhina EI, Potekaev NN, Kochetkov MA, Zhukova OV, Ostretsova MN, Mednikova MA, Bogdel AM. Mastocytosis: retrospective analysis of maculopapular cutaneous form. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2023;(6):180-185. doi: 10.21518/ms2022-005
9. Alvarez-Twose I, Vañó-Galván S, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Matito A, Torrelo A, Jaén P, Schwartz LB, Orfao A, Escribano L. Increased serum baseline tryptase levels and extensive skin involvement are predictors for the severity of mast cell activation episodes in children with mastocytosis. *Allergy*. 2012;67(6):813-21. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02812.x
10. Czarny J, Żuk M, Zawrocki A, Plata-Nazar K, Biernat W, Niedozytko M, Ługowska-Umer H, Niedozytko B, Wasąg B, Nowicki RJ, Lange M. New Approach to Paediatric Mastocytosis: Implications of KIT D816V Mutation Detection in Peripheral Blood. *Acta Derm Venereol*. 2020;100(10):adv00149. doi: 10.2340/00015555-3504
11. Valent P, Akin C, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Hermine O, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, George TI, Kluin-Nelemans HC, Ustun C, Triggiani M, Brockow K, Gotlib J, Orfao A, Kovanen PT, Hadzijusufovic E, Sadovnik I, Horny HP, Arock M, Schwartz LB, Austen KF, Metcalfe DD, Galli SJ. Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics*. 2020;10(23):10743-10768. doi: 10.7150/thno.46719
12. Lange M, Ługowska-Umer H, Niedozytko M, Wasąg B, Limon J, Żawrocki A, Niedozytko B, Sobjanek M, Plata-Nazar K, Nowicki R. Diagnosis of Mastocytosis in Children and Adults in Daily Clinical Practice. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(3):292-297. doi: 10.2340/00015555-2210
13. Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Mortz CG, Kjaer HF, Ollert M, Møller MB, Broesby-Olsen S. Mastocytosis Centre Odense University Hospital (MastOUH). Prospective evaluation of the diagnostic value of sensitive KIT D816V mutation analysis of blood in adults with suspected systemic mastocytosis. *Allergy*. 2017;72(11):1737-1743. doi: 10.1111/all.13187
14. Broesby-Olsen S, Dybedal I, Gülen T, Kristensen TK, Møller MB, Ackermann L, Sääf M, Karlsson MA, Agertoft L, Brixen K, Hermann P, Stylianou E, Mortz CG, Torfing T, Havelund T, Sander B, Bergström A, Bendix M, Garvey LH, Bjerrum OW, Valent P, Bindslev-Jensen C, Nilsson G, Vestergaard H, Hägglund H. Multidisciplinary Management of Mastocytosis: Nordic Expert Group Consensus. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(5):602-12. doi: 10.2340/00015555-2325
15. Russell N, Jennings S, Jennings B, Slee V, Sterling L, Castells M, Valent P, Akin C. The Mastocytosis Society Survey on Mast Cell Disorders: Part 2-Patient Clinical Experiences and Beyond. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(4):1157-1165.e6. doi: 10.1016/j.jaip.2018.07.032
16. Kiszewski AE, Durán-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutiérrez-Castrellón P, Ruiz-Maldonado R. Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;18(3):285-90. doi: 10.1111/j.1468-3083.2004.00830.x
17. Castells M, Metcalfe DD, Escribano L. Diagnosis and treatment of cutaneous mastocytosis in children: practical recommendations. *Am J Clin Dermatol*. 2011;12(4):259-70. doi: 10.2165/11588890-000000000-00000

## Особенности клинического течения мономорфного типа пятнисто-папулезного кожного мастоцитоза

Е.И. Касихина<sup>1,2</sup>  , А.Я. Нада<sup>2</sup> , М.Н. Острецова<sup>2</sup> ,  
О.В. Жукова<sup>1,2</sup> , М.А. Кочетков<sup>1</sup> , Р.А. Ханферьян<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

 kasprof@bk.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Мономорфный вариант течения пятнисто-папулезного кожного мастоцитоза (ППКМ) был выделен относительно недавно. У детей и подростков с мономорфным типом ППКМ (паттерн взрослого типа) клинические проявления в дальнейшем сохраняются во взрослом возрасте и могут трансформироваться в системный процесс, что определяет необходимость регулярного наблюдения за данной категорией пациентов. *Цель.* Проанализировать данные результатов клинико-лабораторного и инструментального исследования у подростка с мономорфным типом ППКМ. *Материал и методы.* В статье представлены результаты наблюдения пациента-подростка в ГБУЗ «Московский центре дерматовенерологии и косметологии». При клинико-лабораторном обследовании и патоморфологическом исследовании был определен мономорфный тип ППКМ. Процесс был представлен множественными высыпаниями на коже туловища и конечностей. Феномен Дарье положительный. Уровень сывороточной триптазы у пациента превышал возрастную норму. Поздний дебют (в 12 лет) заболевания, повышенный уровень триптазы, неврологические симптомы, риск развития анафилаксии вызывали настороженность в отношении развития системной формы, в связи с чем были проведены ультразвуковое исследование органов брюшной полости и определение наличия мутации в гене К1Т в периферической крови. *Заключение.* Сочетание клинических и лабораторных данных позволяет минимизировать количество инвазивных процедур у детей с КМ. Оценка динамики уровня триптазы, определение мутаций в гене К1Т и УЗ-исследование органов брюшной полости могут быть полезны для своевременной диагностики системного мастоцитоза, что позволяет проводить коррекцию статуса заболевания и лекарственную терапию.

**Ключевые слова:** пятнисто-папулезный кожный мастоцитоз, мономорфный тип, дети, подростки, диагностика

**Информация о финансировании.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

**Вклад авторов:** Е.И. Касихина, А.Я. Нада, О.В. Жукова — концепция, планирование исследования, сбор и систематизация данных, написание текста. М.А. Кочетков — фотодокументирование и дерматоскопия, описание результатов исследования. М.Н. Острецова, Р.А. Ханферьян — написание и редактирование 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 конфликтов интересов.

**Этическое утверждение.** Проведение исследования согласовано с локальным комитетом по этике при ГБУЗ «Московский Центр дерматовенерологии и косметологии» (протокол № 58 от 31 марта 2022 года).

**Благодарности** — неприменимо.

**Информационное согласие на публикацию** — участнику и его матери была предоставлена форма информированного согласия, четко объясняющая процедуры исследования, риски и правила поведения в случае возникновения каких-либо

чрезвычайных ситуаций. Информационное согласие добровольно подписано матерью пациента. Личные данные участника сохранялись конфиденциальными и использовались только в научных целях.

Поступила 24.02.2024. Принята 12.04.2024.

**Для цитирования:** Касихина Е.И., Нада А.Я., Острецова М.Н., Жукова О.В., Кочетков М.А., Ханферьян Р.А. Особенности клинического течения мономорфного типа пятнисто-папулезного кожного мастоцитоза // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 27. № 3. С. 382–389. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-382-389. EDN: EUGQPP.

*Corresponding author:* Kasikhina Elena Igorevna — PhD, MD, Associate Professor, Department of Dermatovenereology, Allergology and Cosmetology, Institute of Medicine, RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, Russian Federation; Leading Researcher, Dermatologist, Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, 119071, Leninsky Ave., 17, Moscow, Russian Federation. E-mail: kasprof@bk.ru

Kasikhina E.I. ORCID 0000-0002-0767-8821

Nada A.Y. ORCID 0009-0002-1193-3247

Ostretsova M.N. ORCID 0000-0003-3386-1467

Zhukova O.V. ORCID 0000-0001-5723-6573

Kochetkov M.A. ORCID 0000-0002-5788-4666

Khanferyan R.A. ORCID 0000-0003-1178-7534

*Ответственный за переписку:* Касихина Елена Игоревна — к. м. н., врач-дерматовенеролог, Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Российская Федерация, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 17; доцент кафедры дерматовенерологии, аллергологии и косметологии медицинского института, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: kasprof@bk.ru

Касихина Е.И. SPIN 2244-5426; ORCID 0000-0002-0767-8821

Нада А.Я. SPIN 3873-9444; ORCID 0009-0002-1193-3247

Острецова М.Н. SPIN 5767-7621; ORCID 0000-0003-3386-1467

Жукова О.В. SPIN 8584-7564; ORCID 0000-0001-5723-6573

Кочетков М.А. SPIN 3480-2715; ORCID 0000-0002-5788-4666

Ханферьян Р.А. SPIN 1091-8405; ORCID 0000-0003-1178-7534



## АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-390-402  
EDN: EXOEGJ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ORIGINAL RESEARCH

### Уровень копийности митохондриальной ДНК в культуральной среде эмбрионов человека как фактор прогноза наступления и пролонгирования беременности

О.И. Лисицына  , Н.П. Макарова , А.М. Красный ,  
А.Н. Екимов , А.Ю. Романов , Н.В. Долгушина 

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация  
 o\_yazykova@inbox.ru

**Аннотация.** *Актуальность.* Ключевой фактор, оказывающий влияние на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий — это качество эмбриона, переносимого в полость матки. Цель — изучение возможности использования количественной оценки уровня геномной (гДНК), митохондриальной ДНК (мтДНК) в отработанной культуральной среде (ОКС) и мтДНК в трофэктодерме (ТФЭ) как маркера успешной имплантации и продолжающейся более 12 недель беременности. Материалы и методы. В исследование включены 195 образцов ОКС от 93 пар с бесплодием. Перенос размороженного эмбриона произведен у 43 пациенток. Проанализирован уровень гДНК, мтДНК в ОКС методом ПЦР в реальном времени и мтДНК в ТФЭ методом NGS в зависимости от хромосомного статуса эмбрионов и исходов переносов размороженного эмбриона (ПРЭ) в полость матки. Статистический анализ

© Лисицына О.И., Макарова Н.П., Красный А.М., Екимов А.Н., Романов А.Ю., Долгушина Н.В., 2024



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

проводился в программе Jamovi. Результаты и обсуждение. В зависимости от исхода переноса пациентки были разделены на группы: 1 группа — отрицательный результат, n=18; 2 группа — продолжающаяся более 12 недель беременность, n=25. мтДНК и гДНК в ОКС были статистически значимо ниже в группе 2 по сравнению с группой 1 (p=0,007 и p=0,01, соответственно). При уровне мтДНК в ОКС < 95 копий шансы наступления и сохранения беременности повышались в 3,2 раза (95 % ДИ=1,1–31,6). Предложены формулы прогноза вероятности продолжающейся беременности после ПРЭ для непрерывных показателей (Se модели составила 67,0 %, Sp — 91 %, площадь под кривой (AUC — 90,0 %) и бинарных показателей (Se модели составила 75,0 %, Sp — 70 %, AUC — 83,8 %). Таким образом, уровень копийности гДНК и мтДНК в культуральной среде эмбрионов является значимым прогностическим фактором наступления и пролонгирования беременности в программах ВРТ. В зависимости от плоидности blastocyst был проанализирован уровень мтДНК в ТФЭ, гДНК и мтДНК в ОКС эмбрионов в группах 1.1. (эуплоидные, n=98) и 2.1. (анеуплоидные, n=97). Не было выявлено каких-либо отличий в сравниваемых группах. Выводы. Оценка уровня гДНК и мтДНК в ОКС может быть дополнительным неинвазивным маркером для отбора эуплоидного эмбриона, наиболее перспективного для переноса в полость матки.

**Ключевые слова:** внеклеточная ДНК, митохондриальная ДНК, отработанная культуральная среда, ОКС, трофэктодерма, ВРТ, качество эмбрионов

**Информация о финансировании.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

**Вклад авторов.** Концепция и дизайн исследования — О.И. Лисицына, Н.П. Макарова, Н.В. Долгушина. Сбор и обработка материала — О.И. Лисицына, А.М. Красный, А.Н. Екимов. Анализ данных — О.И. Лисицына, Н.В. Долгушина, А.Ю. Романов. Написание текста и оформление статьи — О.И. Лисицына. Редактирование — О.И. Лисицына, Н.П. Макарова

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

**Этическое утверждение.** Исследование одобрено Этическим комитетом при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.10.2021 года. Протокол № 10.

**Благодарности** — неприменимо.

**Информированное согласие на публикацию.** Все участники исследования добровольно подписали 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 04.03.2024. Принята 16.04.2024.

**Для цитирования:** Лисицына О.И., Макарова Н.П., Красный А.М., Екимов А.Н., Романов А.Ю., Долгушина Н.В. Уровень копийности митохондриальной ДНК в культуральной среде эмбрионов человека как фактор прогноза наступления и пролонгирования беременности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 390–402. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-390-402. EDN: EXOEGJ.

# Mitochondrial DNA copy number level in the culture medium of human embryos as a factor in predicting the onset and prolongation of pregnancy

Olga I. Lisitsyna  , Nataliya P. Makarova , Aleksey M. Krasnyi ,  
Alexey N. Ekimov , Andrey Yu. Romanov , Nataliya V. Dolgushina 

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation  
 o\_yazykova@inbox.ru

**Abstract. Relevance.** A key factor influencing the effectiveness of assisted reproductive technology programmes is the quality of the embryo transferred into the uterine cavity. The aim is to investigate the possibility of using quantitative assessment of genomic (gDNA), mitochondrial DNA (mtDNA) levels in spent culture medium (SCM) and mtDNA in the trophoctoderm (TE) as a marker of successful implantation and pregnancy lasting more than 12 weeks. **Materials and Methods.** The study included 195 SCM samples from 93 couples with infertility. Frozen embryo transfer (FET) was performed in 43 patients. The level of gDNA, mtDNA in SCM by real-time PCR and mtDNA in TE by NGS was analysed depending on the chromosomal status of embryos and the outcome of FET. Statistical analyses were performed in Jamovi software. **Results and Discussion.** Depending on the outcome of transfer, the patients were divided into groups: Group 1 — negative result, n=18; Group 2 — pregnancy continuing for more than 12 weeks, n=25. mtDNA and gDNA in SCM were statistically significantly lower in group 2 compared to group 1 ( $p=0.007$  and  $p=0.01$ , respectively). When mtDNA levels in SCM were  $<95$  copies, the odds of pregnancy rate and ongoing pregnancy were increased 3.2-fold (95 % CI=1.1–31.6). Prediction formulas for the probability of ongoing pregnancy after FET were proposed for continuous (sensitivity was 67.0 %, specificity was 91 %, area under the curve (AUC) was 90.0 %) and binary (sensitivity was 75.0 %, specificity was 70 %, AUC was 83.8 %). Thus, the level of gDNA and mtDNA copy number in the embryo culture medium is a significant prognostic factor for the onset and prolongation of pregnancy in ART programmes. Depending on the ploidy of the blastocysts, we analysed the level of mtDNA in TE, gDNA and mtDNA in the SCM of embryos in groups 1.1. (euploid, n=98) and 2.1. (aneuploid, n=97). No differences were detected in the compared groups. **Conclusion.** Assessment of gDNA and mtDNA levels in SCM may be an additional non-invasive marker for selection of the most promising euploid embryo for transfer into the uterine cavity.

**Keywords:** extracellular DNA, mitochondrial DNA, spent culture medium, SCM, trophoctoderm, ART, embryo quality

**Funding.** The authors received no financial support for the research.

**Author contributions.** Conceptualisation — O.I. Lisitsyna, N.P. Makarova, N.V. Dolgushina. Data collection — O.I. Lisitsyna, A.M. Krasnyi, A.N. Ekimov. Data analysis — O.I. Lisitsyna, N.V. Dolgushina, A. Yu. Romanov. Writing — original draft and visualization — O.I. Lisitsyna. Editing — O.I. Lisitsyna, N.P. Makarova.

**Conflict of interest statement.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Ethics approval.** The study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 10 of 28 October 2021). The patients submitted the informed consent to study participation.

**Acknowledgements** — not applicable.

**Consent for publication.** All study participants signed informed consent to participate in the study to participate in the study in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), the processing of personal data and consent to publication.

Received 04.03.2024. Accepted 16.04.2024.

**For citation:** Lisitsyna OI, Makarova NP, Krasnyi AM, Ekimov AN, Romanov AYu, Dolgushina NV. Mitochondrial DNA copy number level in the culture medium of human embryos as a factor in predicting the onset and prolongation of pregnancy. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):390–402. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-390-402. EDN: EXOEGJ.

## Введение

Главной задачей лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является помощь в наступлении беременности и рождении здорового ребенка [1, 2]. Качество эмбриона, переносимого в полость матки, является одним из важнейших факторов, влияющих на успех проводимой программы. В качестве косвенных показателей имплантационного потенциала эмбрионов в клинической практике оценивают качество эмбрионов по морфологии и их хромосомный статус (эуплоидный/анеуплоидный). Однако отличное качество эмбрионов по морфологии не исключает наличия у них анеуплоидий, а для проведения генетического анализа (преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А)) всегда требуется инвазивное вмешательство (наиболее часто — биопсия трофэктодермы), требующее дополнительных временных и технических затрат, и, возможно, отрицательно влияющее на имплантационные возможности эмбриона. Более того, отбор только эуплоидных эмбрионов отличного качества также не гарантирует успешный исход программы ВРТ. Учитывая вышесказанное, особую актуальность в настоящее время приобретает поиск новых неинвазивных подходов к селекции эмбрионов с наивысшим имплантационным потенциалом.

Так, в качестве одной из возможных дополнительных методик исследователи изучают внеклеточную мтДНК в отработанной культуральной среде (ОКС). Известно, что митохондрии в клетке ответственны за производство энергии, принимают участие в поддержании кальциевого гомеостаза, процессах окисления жирных кислот и апоптозе [3]. Предполагается, что уровень мтДНК может отражать энергетическую нагрузку, уровень окислительного стресса, а также компенсаторные возможности клеток. Цель исследования — изучить возможность

использования количественной оценки уровня геномной (гДНК), митохондриальной ДНК (мтДНК) в отработанной культуральной среде (ОКС) и мтДНК в трофэктодерме (ТФЭ) как маркера успешной имплантации и продолжающейся более 12 недель беременности.

## Материалы и методы

Проанализировано 195 образцов отработанных культуральных сред (ОКС) от 93 супружеских пар с бесплодием, обратившихся для проведения цикла ВРТ с ПГТ-А в период с января 2023 года по март 2024 года. Исследование одобрено Этическим Комитетом при ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ от 28.10.2021 года. Протокол № 10. Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

В качестве лабораторного контроля использовали 16 образцов культуральной среды, находящихся в аналогичных условиях культивирования, но не содержащие эмбрионы. Все образцы культуральной среды подвергались криоконсервации после сбора.

Овариальная стимуляция, трансвагинальная пункция яичников проводились по стандартной методике. Оплодотворение ооцитов во всех случаях осуществляли методом интрацитоплазматической инъекции в сперматозоид (ИКСИ) [4]. Все этапы культивирования эмбрионов и морфологическая оценка бластоцист, а также сбор ОКС проводились по ранее описанной методике [4]. В исследование включены образцы ОКС бластоцист, которым была выполнена биопсия трофэктодермы (ТФЭ) и преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии по ранее описанной методике [5].

По результатам ПГТ-А через несколько менструальных циклов 43 пациенткам был выполнен

перенос одного размороженного зуплоидного эмбриона (ПРЭ) в полость матки. ПРЭ и ведение посттрансферного периода осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам.

В зависимости от исхода ПРЭ пациенты были разделены на группы: группа 1 — пациентки, у которых беременность наступила и продолжалась > 12 недель гестации (n=18), группа 2 — пациентки, у которых беременность не наступила или прервалась до 12 недель гестации (n=25). В сравниваемых группах были проанализированы клиничко-анамнестические данные, особенности фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза.

Дополнительно все бластоцисты были стратифицированы на группы по наличию анеуплоидии (n=195): группа 1.1. — зуплоидные бластоцисты (n=98), группа 2.1. — анеуплоидные бластоцисты (n=97).

Для всех 195 полученных бластоцист была выполнена оценка уровня копийности мтДНК в клетках ТФЭ и уровня копийности гДНК и мтДНК в ОКС.

### Оценка уровня копийности мтДНК в трофэктодерме

Определение уровня копийности мтДНК в клетках ТФЭ осуществлялось путем нормировки на аутосомы согласно программному обеспечению SeqVario. Долю мтДНК в ТФЭ исчисляли в относительных единицах (о.е.). Расчет значения определяли путем отношения ридов, выровненных на митохондрию, к количеству всех ридов, выровненных на геном (все хромосомы и митохондрии).

### Оценка уровня копийности мтДНК и гДНК в отработанной культуральной среде

Определение уровня копийности гДНК и мтДНК в ОКС осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили одновременно с двумя наборами праймеров на всем объеме (25 мкл) полученной культуральной среды. Подсчет копий мтДНК проводили по ранее описанной методике [4].

Оценка уровня гДНК проводилась в геномных единицах. Стандарты были приготовлены из лейкоцитов человека. Концентрация ДНК стандарта была установлена на флуориметре qubit 3.0. Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 («Bio Rad», USA). Температурный профиль реакции: 95 °C 5 мин; 40 циклов: 95 °C 10 с., 60 °C 30 с. Исползованные праймеры представлены в табл. 1. Праймеры были подобраны с помощью программного обеспечения Lasergene-Software (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) выбор происходил исходя из максимальной эффективности ПЦР, праймеры были проверены на отсутствие альтернативных продуктов при помощи веб-сервера BiSearch [6]. Полученные данные флюоресценции были пересчитаны в абсолютное количество копий с помощью программного обеспечения амплификатора CFX96 BioRad.

Таблица 1 / Table 1

Последовательности праймеров и зондов / Sequences of primers and probes

Ген / Gene	Последовательность / Sequence	Праймер / Зонд / Primer / Probe
CHR1	CACAGACTGCCTGGAATC	Праймер прямой / Forward primer
	TCCATCTGTCTGTGAAGTGA	Праймер обратный / Reverse primer
	(ROX)ATCTCTAGAAAACCTCTAGAAGAGCTTCA(BHQ2)	Зонд / Probe
MITN	CCACATCTACCATCACCTC	Праймер прямой / Forward primer
	TAGAATAAATAGGAGGCTAGGTT	Праймер обратный / Reverse primer
	(R6G)ATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCA(BHQ2)	Зонд / Probe

## Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводился в программе Jamovi. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные значения и процентные доли от общего числа в группе. Анализ качественных признаков проводили с помощью  $\chi^2$  Пирсона. Для сравнения бинарных данных мерой сравнения явилось ОШ с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ). Метод логистической регрессии использовался при расчете ОШ<sub>кор</sub> для контроля конфаундеров. Непрерывные переменные были представлены в виде медианы и межквартильных значений (Me(Q1-Q3)). С целью определения статистической значимости различий непараметрических данных был выбран критерий Манна – Уитни. При проведении ROC-анализа рассчитывали порог отсечки, площадь под ROC-кривой (AUC), рассчитывали чувствительность (Se) и специфичность (Sp) модели. Величину порогового уровня значимости  $p$  принимал и равной 0,05.

## Результаты и обсуждение

В исследование включено 211 образцов культуральной среды: 195 образцов, содержащих эмбрион, от 93 супружеских пар, и 16 образцов — в качестве контроля.

### Клиническая характеристика пациенток, которым был выполнен перенос размороженного эмбриона

После ПРЭ беременность наступила у 22 пациенток, но у 4 из них произошел самопроизвольный выкидыш до 12 недель беременности, поэтому основную группу 1 составили 18 пациенток с продолжающейся >12 недель беременностью, группу сравнения 2–25 пациенток с не наступившей или прервавшейся беременностью. Характеристики групп пациенток представлены в табл. 2. Пациентки группы 1 отличались от пациенток группы 2 тем, что у них было меньше абортос и более длительный период бесплодия в анамнезе, а также в 3 раза чаще выявлялась миома матки. Также в группе 1 в 2,8 раз чаще производился перенос эмбриона отличного качества.

Таблица 2 / Table 2

Характеристики пациенток, которым был выполнен ПРЭ, в зависимости от наступления и пролонгирования беременности после ВРТ (n=43) / Characteristics of patients who underwent FET depending on the onset and prolongation of pregnancy after ART (n=43)

Параметр / Parameter	Группа 1 (беременность+) n=18 / Group 1 (pregnancy+) n=18	Группа 2 (беременность-) n=25 / Group 2 (pregnancy-) n=25	p
Возраст, антропометрические данные, вредные привычки / Age, anthropometric data, bad habits			
Возраст** / Age**	35 (31–37)	36 (34–41)	0,14
ИМТ** / BMI**	22 (20,3–23)	21 (20–24)	0,38
Менструальный цикл и репродуктивная функция / Menstrual cycle and reproductive function			
Число беременностей*** / Number of pregnancies***	0 (0–4)	0 (0–6)	0,12
Число родов*** / Number of births***	0 (0–2)	0 (0–3)	0,28
Число абортос*** / Number of abortions***	0 (0–0)	0 (0–3)	0,03
Анамнез гинекологических заболеваний / History of gynecologic diseases			
Заболевания шейки матки* / Cervical diseases*	4 (22,2 %)	9 (36 %)	0,33
Аденомиоз и/или НГЭ* / Adenomyosis and/or EGE*	6 (33,3 %)	8 (32 %)	0,93
Миома матки* / Uterine myoma*	7 (38,9 %)	3 (12 %)	0,04
Полип эндометрия* / Endometrial polyp*	6 (33,3 %)	10 (40 %)	0,65
СПКЯ* / PCOS*	1 (5,6 %)	0	0,23

Параметр / Parameter	Группа 1 (беременность+) n=18 / Group 1 (pregnancy+) n=18	Группа 2 (беременность-) n=25 / Group 2 (pregnancy-) n=25	p
Анамнез гинекологических оперативных вмешательств / History of gynecologic surgical procedures			
Тубэктомия* / Tubectomy*	2 (11,1 %)	4 (16 %)	0,65
Гистероскопия* / Hysteroscopy*	12 (66,7 %)	11 (44 %)	0,14
Оперативные вмешательства на яичниках* / Ovarian surgery*	5 (27,8 %)	2 (8 %)	0,08
Анамнез заболевания на момент цикла овариальной стимуляции / Medical history at the time of the ovarian stimulation cycle			
Первичное бесплодие* / Primary infertility*	10 (55,6 %)	10 (40 %)	0,31
Длительность бесплодия, лет** / Duration of infertility, years**	5 (3,5–8,7)	2 (1–5)	0,04
Уровень АМГ, нг/мл** / AMH level, ng/mL**	1,4 (0,8–3,2)	2,1 (1,5–3,6)	0,47
Характеристики протокола овариальной стимуляции / Characteristics of the ovarian stimulation protocol			
Номер попытки ЭКО** / IVF number**	3 (1–5)	2 (1–4)	0,36
Длительность стимуляции, дней** / Duration of ovarian stimulation, days**	10 (9–11)	10 (9–11)	0,90
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ** / Total dose of gonadotropins, IU**	1800 (1500–2156)	1650 (1500–2400)	0,88
Характеристики эмбриологического этапа цикла овариальной стимуляции / Characteristics of the embryologic stage of the ovarian stimulation cycle			
Число зрелых ооцитов** / Number of mature oocytes**	6 (3–12)	6 (5–11)	0,71
Число зигот** / Number of zygotes**	5 (3–10)	6 (4–11)	0,48
Характеристики эмбрионов / Characteristics of embryos			
Экспансия бластоцисты на 5-е сутки* / Blastocyst expansion on the 5th day*	13 (72,2 %)	15 (60 %)	0,41
Перенос бластоцисты отличного качества* / Transfer of excellent quality blastocyst *	8 (44,4 %)	4 (16 %)	0,04

Примечание: abs (%),  $\chi^2$ -тест, \*\* Me (Q25-Q75), \*\*\* Me (min-max), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия группы 1 от группы 2 ( $p \leq 0,05$ ); ИМТ – индекс массы тела, НГЭ – наружный генитальный эндометриоз, СПКЯ – синдром поликистозных яичников, АМГ – антимюллеров гормон.

Note: \*abs (%),  $\chi^2$  test, \*\* Me (Q25-Q75), \*\*\* Me (min-max), Mann – Whitney test, significant differences between group 1 and group 2 ( $p \leq 0,05$ ); BMI – body mass index, EGE – external genital endometriosis, PCOS – polycystic ovary syndrome, AMH – anti-müllerian hormone.

Сравнение клинических исходов, уровня копийности мтДНК в клетках трофэктодермы, гДНК и мтДНК в отработанной культуральной среде эмбрионов после переноса размороженного эмбриона.

На первом этапе выполнили анализ уровня ДНК в ОКС в сравнении с контрольными каплями (которые находились в тех же условиях культивирования, но не содержали эмбрион) (табл. 3).

Таблица 3 / Table 3

**Уровень копийности гДНК и мтДНК в ОКС в каплях, содержащих эмбрион, и контрольных каплях /  
Copy number levels of gDNA and mtDNA in SCM in embryo-containing droplets and control droplets**

Параметр / Parameter	Эмбрионы n=195 / Embryos n=195	Контрольные капли n=16 / Control drops n=16	p
мтДНК в ОКС / mtDNA in SCM	134 (50,0–256)	32,2 (10,6–63,9)	<0,001
мтДНК/гДНК / mtDNA/gDNA	11,4 (6,47–26,1)	2,52 (1,36–7,92)	<0,001

*Примечание:* Me(Q25-Q75), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия между группами ( $p \leq 0,05$ ); ОКС – отработанная культуральная среда, мтДНК – митохондриальная ДНК, гДНК – геномная ДНК

*Note:* Me(Q25-Q75), Mann – Whitney test, significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ); SCM – spent culture medium, mtDNA – mitochondrial DNA, gDNA – genomic DNA

Уровень копийности мтДНК и мтДНК/гДНК в ОКС был статистически значимо выше, чем в контрольных каплях. Учитывая, что мтДНК и гДНК в ОКС была также детектирована в контрольных каплях, следует предположить возможность некоторой контаминации на эмбриологическом или лабораторном этапах. Возможные причины кон-

таминации и методы ее профилактики обсуждены в предыдущих исследованиях [4].

Далее уровень копийности мтДНК в клетках ТФЭ, гДНК и мтДНК в ОКС эмбрионов был проанализирован в зависимости от факта продолжающейся клинической беременности >12 недель — в группах 1 и 2 (табл. 4).

Таблица 4 / Table 4

**Уровень копийности гДНК, мтДНК, мтДНК/гДНК в ОКС, мтДНК в ТФЭ  
в зависимости от продолжающейся >12 недель беременности после ПРЭ /  
Copy number levels of gDNA, mtDNA, mtDNA/gDNA in SCM, and mtDNA in TE as a function of continued >12 weeks gestation after FET**

Параметр / Parameter	Группа 1 n=18 / Group 1 n=18	Группа 2 n=25 / Group 2 n=25	p
мтДНК в ТФЭ (о. е.) / mtDNA in TE (relative units)	0,002 (0,002–0,003)	0,002 (0,001–0,003)	0,43
гДНК в ОКС (число копий) / gDNA in SCM (copy number)	4,1 (3,5–6,6)	9,0 (6,3–17,8)	0,01
мтДНК в ОКС (число копий) / mtDNA in SCM (copy number)	49,3 (20,7–126)	264 (154–382)	0,007
мтДНК/гДНК в ОКС / mtDNA/gDNA in SCM	8,6 (5,4–27,5)	17,2 (9,9–55,4)	0,09

*Примечание:* Me(Q25-Q75), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия между группами ( $p \leq 0,05$ ); ТФЭ – трофэктодерма, ОКС – отработанная культуральная среда, мтДНК – митохондриальная ДНК, гДНК – геномная ДНК

*Note:* Me(Q25-Q75), Mann – Whitney test, significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ); TE – trophectoderm, SCM – spent culture medium, mtDNA – mitochondrial DNA, gDNA – genomic DNA

Уровень копийности мтДНК и гДНК в ОКС был статистически значимо ниже в группе 1 (продолжающаяся беременность >12 недель) по сравнению с группой 2. Отличий в уровне копийности мтДНК в ТФЭ выявлено не было.

Был проведен многофакторный анализ для оценки ОШ<sub>кор</sub> продолжающейся беременности > 12 недель после переноса зуплоидного

эмбриона с учетом выявленных конфаундеров: число аборт в анамнезе, длительность бесплодия и частота миомы матки, качество переносимого эмбриона. Были созданы модели прогноза продолжающейся беременности, в которой статистической значимостью обладали следующие факторы: мтДНК и гДНК в ОКС и качество переносимого эмбриона.

Для каждой количественной величины (мтДНК в ОКС, гДНК в ОКС) был найден порог отсечки: для мтДНК в ОКС он составил 95 копий ( $Se=66,7\%$ ,  $Sp=80\%$ ,  $AUC=73\%$ ,  $p=0,008$ ), для гДНК в ОКС — 5 копий ( $Se=58\%$ ,  $Sp=85\%$ ,  $AUC=71\%$ ,  $p=0,01$ ). ОШ<sub>кор</sub> наступления и пролонгирования беременности при уровне мтДНК в ОКС <95 копий с учетом указанных конфаундеров составил 3,2 (95 % ДИ=1,1–31,6).

Была получена следующая формула прогноза вероятности продолжающейся беременности после ПРЭ с включением количественных показателей ( $Se$  модели составила 67,0 %,  $Sp$  — 91 %, площадь под кривой ( $AUC$ ) — 90,0 %) (формула (1), рис. 1).

$$P(PB) = \left( \frac{\text{Exp}[0,52-0,002*mtDNA - 0,16*gDNA + 2,0*Кач]}{1 + \text{Exp}[0,52-0,002*mtDNA - 0,16*gDNA + 2,0*Кач]} \right) * 100\% \quad (1)$$

где  $P(PB)$  — вероятность продолжающейся беременности после ПРЭ;  $\text{Exp}$  — экспонента;  $mtDNA$  — копийность мтДНК в ОКС;  $gDNA$  — копийность гДНК в ОКС;  $Кач$  — перенос бластоцисты отличного качества

$$P(PB) = \left( \frac{\text{Exp}[0,52-0,002*mtDNA - 0,16*gDNA + 2,0*quality]}{1 + \text{Exp}[0,52-0,002*mtDNA - 0,16*gDNA + 2,0*quality]} \right) * 100\% \quad (1)$$

where  $P(PB)$  is the probability of continued pregnancy after FET;  $\text{Exp}$  — exponent;  $mtDNA$  — mtDNA copy number in SCM;  $gDNA$  — gDNA copy number in SCM;  $quality$  — transfer of excellent quality blastocyst

Кроме того, была получена следующая формула прогноза вероятности продолжающейся беременности после ПРЭ с включением бинарных показателей ( $Se$  модели составила 75,0 %,  $Sp$  — 70 %, площадь под кривой ( $AUC$ ) — 83,8 %) (формула (2)).

$$P(PB) = \left( \frac{\text{Exp}[-1,14+1,5*mtDNA < 95+2,4*gDNA < 5+1,2*Кач]}{1 + \text{Exp}[-1,14+1,5*mtDNA < 95+2,4*gDNA < 5+1,2*Кач]} \right) * 100\% \quad (2)$$

где  $P(PB)$  — вероятность продолжающейся беременности после ПРЭ;  $\text{Exp}$  — экспонента;  $mtDNA$  — копийность мтДНК в ОКС;  $gDNA$  — копийность гДНК в ОКС;  $Кач$  — перенос бластоцисты отличного качества

$$P(PB) = \left( \frac{\text{Exp}[-1,14+1,5*mtDNA < 95+2,4*gDNA < 5+1,2*quality]}{1 + \text{Exp}[-1,14+1,5*mtDNA < 95+2,4*gDNA < 5+1,2*quality]} \right) * 100\% \quad (2)$$

where  $P(PB)$  is the probability of continued pregnancy after FET;  $\text{Exp}$  — exponent;  $mtDNA$  — mtDNA copy number in SCM;  $gDNA$  — gDNA copy number in SCM;  $quality$  — transfer of excellent quality blastocyst

ROC кривая / ROC curve

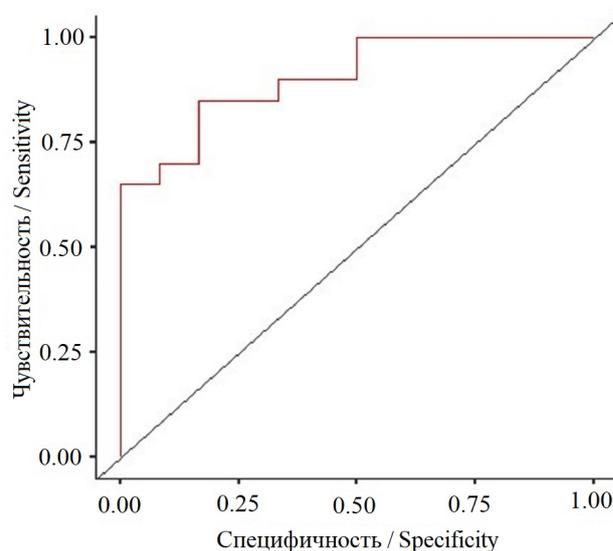


Рис. 1. ROC-кривая для модели оценки вероятности продолжающейся беременности (>12 недель) после переноса эуплоидного эмбриона в зависимости от уровня копийности мтДНК и гДНК в ОКС

Fig. 1. ROC curve for a model to estimate the probability of ongoing pregnancy (>12 weeks) after euploid embryo transfer as a function of mtDNA and gDNA copy number levels in SCM

Дополнительно был проанализирован уровень копийности мтДНК в клетках ТФЭ, гДНК и мтДНК в ОКС эмбрионов в зависимости от пloidности бластоцист — в группах 1.1. и 2.1. (табл. 5). Не было выявлено каких-либо отличий в сравниваемых группах.

В представленной работе изучалась зависимость между характеристиками пациенток, хромосомным статусом эмбрионов и уровнем гДНК и мтДНК в ОКС, а также уровнем мтДНК в ТФЭ. В качестве контроля использовался уровень мтДНК в образцах культуральной среды, не содержащей эмбрионы и находившейся в тех же условиях.

Таблица 5 / Table 5

Уровень копийности гДНК и мтДНК в ОКС, мтДНК в ТФЭ в зависимости от плоидности бластоцист по результатам ПГТ-А /  
Copy number levels of gDNA and mtDNA in SCM, mtDNA in TE depending on the ploidy of blastocysts according to PGT-A results

Параметр / Parameter	Группа 1.1. (эуплоидные эмбрионы) n=98 / Group 1.1 (euploid embryos) n=98	Группа 1.2 (анеуплоидные эмбрионы) n=97 / Group 1.2 (aneuploid embryos) n=97	p
мтДНК в ТФЭ (о.е.) / mtDNA in TE (relative units)	0,002 (0,002–0,003)	0,002 (0,001–0,003)	0,87
гДНК в ОКС (число копий) / gDNA in SCM (copy number)	8,3 (5,2–16,6)	10,0 (4,8–18,4)	0,99
мтДНК в ОКС (число копий) / mtDNA in SCM (copy number)	148 (53,5–259)	113 (42,0–253)	0,62
мтДНК/гДНК в ОКС / mtDNA/gDNA in SCM	11,6 (6,6–28,3)	11,3 (6,0–21,3)	0,59

Примечание: Me(Q25-Q75), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия между группами ( $p \leq 0,05$ ); ТФЭ – трофэктодерма, ОКС – отработанная культуральная среда, мтДНК – митохондриальная ДНК, гДНК – геномная ДНК

Note: Me(Q25-Q75), Mann – Whitney test, significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ); TE – trophectoderm, SCM – spent culture medium, mtDNA – mitochondrial DNA, gDNA – genomic DNA

В представленной работе изучалась зависимость между характеристиками пациенток, хромосомным статусом эмбрионов и уровнем гДНК и мтДНК в ОКС, а также уровнем мтДНК в ТФЭ. В качестве контроля использовался уровень мтДНК в образцах культуральной среды, не содержащей эмбрионы и находившейся в тех же условиях.

Согласно полученным результатам уровень копийности мтДНК и гДНК в ОКС был статистически значимо ниже в группе с продолжающейся беременностью > 12 недель по сравнению с группой без наступления беременности или ее прерыванием в первом триместре. При уровне мтДНК в ОКС < 95 копий шансы наступления и сохранения беременности повышались в 3,2 раза.

Некоторые исследователи также изучали вопрос возможной предикции исхода переноса эмбриона в зависимости от уровня мтДНК в ОКС и/или уровня мтДНК в ТФЭ. По одним данным, повышенный уровень мтДНК в ОКС эмбрионов ассоциирован с успешным исходом переноса и наступившей беременностью [7, 8]. По другим данным, связь между уровнем мтДНК в ОКС и частотой клинической беременности не была найдена [4, 9].

Кроме того, согласно результатам работы, отличий в уровне копийности мтДНК в ТФЭ выявлено не было. Полученные нами данные согласуются с рядом научных работ, представивших аналогич-

ные выводы [5, 10–12]. Однако, согласно данным литературы, другие ученые показали повышенный потенциал к имплантации и успешной беременности для эмбрионов со сниженным уровнем мтДНК в клетках ТФЭ [3, 13–16].

В приведенной работе дополнительно изучалась зависимость между уровнем мтДНК и гДНК в ОКС, а также мтДНК в ТФЭ с учетом наличия анеуплоидий у эмбрионов. Значимых отличий нами не обнаружено, что согласуется с результатами других исследователей, получивших аналогичные данные [9, 11, 17]. В литературе также обсуждается взаимосвязь между уровнем мтДНК в ТФЭ и хромосомным статусом эмбрионов. Так, одни авторы показали повышение уровня мтДНК в ТФЭ анеуплоидных эмбрионов, в сравнении с эуплоидными [18]. В то же время, другие ученые статистически значимой разницы не обнаружили [11].

Массив работ, представленных к настоящему времени в мировой литературе, представляет разношерстные, часто противоположные данные о зависимости уровня гДНК и мтДНК в ОКС и качестве эмбрионов. Большинство работ включают небольшие выборки пациентов и не оценивают их репродуктивные исходы.

Кроме того, подобная широкая вариабельность результатов может быть связана с особенностями работы митохондрий в разные фазы деления эмбрионов. Так, с самого начала развития эмбриона функция

указанных органелл зависит именно от митохондрий, привнесенных ооцитом [3, 19–21]. Далее, следует отметить, что согласно теории «горлышка от бутылки» («mtDNA bottleneck theory»), в первые дни развития эмбриона общее количество митохондрий зиготы разделяется между клетками эмбриона при делении, а собственная репликация митохондриальной ДНК активируется к 3 суткам развития и значительно усиливается к 5 суткам [8, 19–21].

Теория «тихого эмбриона» представляет меньшее количество мтДНК в клетках ТФЭ бластоцист различного и хорошего качества, находящихся в оптимальных условиях, не требующих повышения интенсивности энергетического метаболизма для борьбы со «стрессом» [3, 5, 19]. Однако каким именно образом происходит распределение мтДНК в клетках эмбриона (для внутренней клеточной массы и ТФЭ) и выделение внеклеточной ДНК в ОКС, остается неизвестным. Исследований, одновременно оценивающих соотношение уровня гДНК и мтДНК в клетках эмбриона и ОКС в зависимости от его качества или потенциала к имплантации, в настоящее время в литературе не представлено. В то же время, согласно полученным в настоящей работе результатам, повышенный уровень мтДНК в клетках ТФЭ и сниженный уровень мтДНК в ОКС отмечался у эмбрионов с более высоким потенциалом к имплантации и продолжающейся беременности. Представленные данные не противоречат описанным выше теориям и согласуются с представлениями о том, что сбалансированное достаточное функционирование митохондрий в клетках эмбриона сопряжено с повышенным содержанием мтДНК в ТФЭ и, соответственно, со сниженным количеством мтДНК в ОКС. И, наоборот, для эмбрионов со сниженным потенциалом к продолжающейся беременности, нарушенная функция митохондрий в клетках и «энергетический стресс» приводят к снижению мтДНК в ТФЭ и, возможно, повреждению клеток и выходу мтДНК в ОКС, повышая ее концентрацию.

### Выводы

Несмотря на то, что ВРТ интенсивно развиваются и появляются новые эмбриологические методики с целью повышения эффективности лечения беспло-

дия, не менее половины циклов ЭКО заканчиваются неудачным исходом. В ходе настоящей работы было показано, что уровень копийности гДНК и мтДНК в ОКС является значимым прогностическим фактором наступления и пролонгирования беременности. Так, более низкие показатели уровня мтДНК в ОКС связаны с повышением вероятности наступления и пролонгирования беременности > 12 недель. По результатам проведенного исследования предложена формула расчета вероятности успешного исхода переноса эмбриона по уровню внеклеточной ДНК в ОКС, позволяющая производить отбор лучших эмбрионов для переноса в полость матки для увеличения эффективности лечения бесплодия методами ВРТ и снижения репродуктивных потерь.

### References/Библиографический список

1. Kravtsova EI, Kolesnikova NV, Lukoshkina IN, Uryupina KV, Avakimyan VA. Immunological and immunohistochemical features of endometrial implantation factor in healthy patients of late reproductive age. RUDN Journal of Medicine. 2023;27(1):46–56. (In Russian). [Кравцова Е.И., Колесникова Н.В., Лукошкина И.Н., Урюпина К.В., Авакимян В.А. Иммунологические и иммуногистохимические особенности имплантационного фактора эндометрия у здоровых пациенток позднего репродуктивного возраста // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 1. С. 46–56.] doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-1-46-56
2. Semyatov SM, Leffad LM. Prediction of infertility in patients with uterine leiomyoma. RUDN Journal of Medicine. 2022;26(4):396–403. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-4-396-403
3. Lledo B, Ortiz JA, Morales R, García-Hernández E, Ten J, Bernabeu A, Llácer J, Bernabeu R. Comprehensive mitochondrial DNA analysis and IVF outcome. Hum Reprod Open. 2018;4: hoy023. doi:10.1093/hropen/hoy023
4. Makarova NP, Lisitsyna OI, Nepsha OS, Krasnyi AM, Sadekova AA, Nezlina AL, Dolgushina NV, Zingerenko BV, Kalinina EA. Mitochondrial DNA expression profile in embryo culture medium in assisted reproductive technology. Obstetrics and Gynecology. 2022;3:89–96. (In Russian). [Макарова Н.П., Лисицына О.И., Непша О.С., Красный А.М., Садекова А.А., Незлина А.Л., и др. Особенности профиля экспрессии митохондриальной ДНК в среде культивирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2022. № 3. С. 89–96.] doi:10.18565/aig.2022.3.89-96
5. Nepsha OS, Kulakova EV, Ekimov AN, Drapkina YuS, Makarova NP, Kraevaya EE, Kalinina EA. Value of embryonic mitochondrial DNA in predicting the effectiveness of assisted reproductive technologies. Obstetrics and Gynecology. 2021;11:125–

134. (In Russian). [Непша О.С., Кулакова Е.В., Екимов А.Н., Дранкина Ю.С., Макарова Н.П., Краевая Е.Е., и др. Использование митохондриальной ДНК эмбрионов в качестве предиктора эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 125–34]. doi:10.18565/aig.2021.11.125-134
6. Arányi T, Váradi A, Simon I, Tusnády GE. The BiSearch web server. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:431. doi: 10.1186/1471-2105-7-431
7. Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini P, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol. Hum. Reprod*. 2014;20(12):1238–46. doi:10.1093/MOLEHR/GAU086
8. Sayed GA, Al-Sawaf HA, Al-Sawaf AH, Saeid M, Maged A, Ibrahim IH. Mitochondrial DNA in Fresh versus Frozen Embryo Culture Media of Polycystic Ovarian Syndrome Patients Undergoing In Vitro Fertilization: A Possible Predictive Marker of a Successful Pregnancy. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021;14:27–38. doi:10.2147/PGPM.S284064
9. Zhang X, Sun Y, Dong X, Zhou J, Sun F, Han T. Mitochondrial DNA and genomic DNA ratio in embryo culture medium is not a reliable predictor for in vitro fertilization outcome. *Sci Rep*. 2019;9:5378. doi:10.1038/S41598-019-41801-1
10. Treff NR, Zhan Y, Tao X, Olcha M, Han M, Rajchel J, Morrison L, Morin SJ, Scott RT Jr. Levels of trophectoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos. *Hum Reprod*. 2017;32(4):954–62. doi:10.1093/humrep/dex034
11. Victor AR, Brake AJ, Tyndall JC, Griffin DK, Zouves CG, Barnes FL, Viotti M. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil Steril*. 2017;107(1):34–42.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.028
12. Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE, Massahi N, Richards JP, Kearns WG, Saad AF, Crochet JR. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2018;35(5):871–7. doi:10.1007/s10815-018-1147-z
13. Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel CE, Kokocinski F, Cohen J, Munne S, Wells D. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS Genet*. 2015;11(6): e1005241. doi:10.1371/journal.pgen.1005241
14. Fragouli E, McCaffrey C, Ravichandran K, Spath K, Grifo JA, Munné S, Wells D. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study. *Hum Reprod*. 2017;32(11):2340–7. doi:10.1093/humrep/dez014
15. Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez S, Al-Asmar N, Riboldi M, Díaz-Gimeno P, Valbuena D, Simón C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil. Steril*. 2015;104(3):534–41.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.05.022
16. Korolkova AI, Mishieva NG, Martazanova BA, Bourmenskaya OV, Ekimov AN, Trofimov Dyu, Veyukova M.A., Kirillova A.O., Abubakirov A.N. Increasing the effectiveness of IVF programs by determining mitochondrial DNA copy number in embryonic trophectoderm. *Obstetrics and Gynecology*. 2019;(3):98–104. (In Russian). [Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Мартазанова Б.А., Бурменская О.В., Екимов А.Н., Трофимов Д.Ю., и др. Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов // Акушерство и гинекология. 2019. № 3. С. 98–104.]. doi:10.18565/aig.2019.3.98-104
17. Zhang J, Xia H, Chen H, Yao C, Feng L, Song X, Bai X. Less-invasive chromosome screening of embryos and embryo assessment by genetic studies of DNA in embryo culture medium. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2019;36(12):2505–13. doi:10.1007/S10815-019-01603-W
18. Lee YX, Chen CH, Lin SY, Lin YH, Tzeng CR. Adjusted mitochondrial DNA quantification in human embryos may not be applicable as a biomarker of implantation potential. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(9):1855–65. doi:10.1007/s10815-019-01542-6
19. Lisitsyna OI, Dolgushina NV, Makarova NP, Burmenskaya OV. Mitochondrial DNA as a quality marker of gametes and embryos in assisted reproductive technologies programs. *Obstetrics and Gynecology*. 2023;(7):20–26. (In Russian). [Лисицына О.И., Долгушина Н.В., Макарова Н.П., Бурменская О.В. Митохондриальная ДНК как маркер качества гамет и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2023. № 7. С. 20–6.]. doi:10.18565/aig.2023.94
20. Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, Henkel R. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*. 2021;53(1): e13666. doi:10.1111/and.13666
21. Desquiret-Dumas V, Clément A, Seegers V, Boucret L, Ferré-L'Hotellier V, Bouet PE, Descamps P, Procaccio V, Reynier P, May-Panloup P. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality. *Hum Reprod*. 2017;32(3):607–14. doi:10.1093/humrep/dew341.

*Ответственный за переписку:* Лисицына Ольга Игоревна — аспирант, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: o\_yazykova@inbox.ru  
Лисицына О.И. SPIN 5211-4258; ORCID: 0000-0002-7775-3508  
Макарова Н.П. SPIN 8498-4890; ORCID: 0000-0003-1396-7272

Красный А.М. SPIN 3949-3450; ORCID: 0000-0001-7883-2702

Екимов А.Н. SPIN 7491-7303; ORCID: 0000-0001-5029-0462

Романов А.Ю. SPIN 6068-4561; ORCID: 0000-0003-1821-8684

Долгушина Н.В. SPIN 1725-9876; ORCID: 0000-0003-1116-138X

*Corresponding author:* Lisitsyna Olga Igorevna — postgraduate student, Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997, Oparina St., 4, Moscow, Russian Federation. E-mail: o\_yazykova@inbox.ru.

Lisitsyna O.I. ORCID: 0000-0002-7775-3508

Makarova N.P. ORCID: 0000-0003-1396-7272

Krasnyi A.M. ORCID: 0000-0001-7883-2702

Ekimov A.N. ORCID: 0000-0001-5029-0462

Romanov A. Yu. ORCID: 0000-0003-1821-8684

Dolgushina N.V. ORCID: 0000-0003-1116-138X