

ISSN 1810-5033

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

Научно-практический и научно-теоретический журнал

МНБ

Издается с января 2001 года
Published since January, 2001

БНМ

Выходит четыре раза в год
Published quartely



2024, Т. 24, № 2

Минск

РЕДАКЦИЯ

Главный редактор

Тапальский Дмитрий Викторович, д.м.н., профессор,
директор Института физиологии НАН Беларуси

Заместитель главного редактора

Чумак Анатолий Георгиевич, д.б.н., профессор,
Белорусский государственный университет

Ответственный секретарь

Филипович Татьяна Александровна, к.б.н., Институт
физиологии НАН Беларуси

Секретарь

Чеботарь Анастасия Олеговна, Институт физиологии
НАН Беларуси

EDITORIAL

Editor-in-Chief

Tapalsky Dmitry Viktorovich, MD, Professor, Director of
the Institute of Physiology of the National Academy of
Sciences of Belarus

Associate Editor-in-Chief

Chumak Anatoly Georgievich, PhD, Professor, Belarusian
State University

Responsible Secretary

Filipovich Tatyana Alexandrovna, PhD, Institute of
Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus

Secretary

Chebotar Anastasiya Olegovna, Institute of Physiology of
the National Academy of Sciences of Belarus

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ (EDITORIAL BOARD):

В. Г. Богдан, д.м.н., профессор, Национальная академия наук Беларуси, **Ф. И. Висмонт**, д.м.н., профессор, член корреспондент НАН Беларуси, Белорусский государственный медицинский университет, **С. В. Губкин**, д.м.н., профессор, член корреспондент НАН Беларуси, Институт физиологии НАН Беларуси, **В. В. Зинчук**, д.м.н., профессор, Гродненский государственный медицинский университет, **И. А. Ильясевич**, д.б.н., доцент, Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, **О. Е. Кузнецов**, к.б.н., доцент, Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, **П. М. Морозик**, к.б.н., доцент, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, **В. А. Мельник**, д.б.н., профессор, Гомельский государственный медицинский университет, **В. Н. Никандров**, д.б.н., профессор, Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка, **В. А. Переверзев**, д.м.н., профессор, Белорусский государственный медицинский университет, **Ю. Я. Родионов**, д.м.н., профессор, Витебский государственный медицинский университет, **Е. И. Слобожанина**, д.б.н., профессор, член корреспондент НАН Беларуси, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, **В. В. Солтанов**, д.б.н., профессор, член корреспондент НАН Беларуси, Институт физиологии НАН Беларуси, **Н. Ф. Сорока**, д.м.н., профессор, Белорусский государственный медицинский университет, **Н. А. Трушель**, д.м.н., профессор, Белорусский государственный медицинский университет, **Т. А. Хрусталева**, к.б.н., доцент, Институт физиологии НАН Беларуси, **Д. Г. Щербин**, д.б.н., доцент, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

**Адрес
редакции:**

Институт физиологии НАН Беларуси
к. 203, ул. Академическая 28,
220072, Минск, Республика Беларусь
Тел./Факс: +375 17 284-16-30;
Электронная почта: journal@fizio.bas-net.by

**Address
of the Editorial Office:**

Institute of Physiology, NAS of Belarus
room 203, Akademicheskaya str. 28,
220072, Minsk, Republic of Belarus
Phone/Fax: +375 17 284-16-30;
E-mail: journal@fizio.bas-net.by

СОДЕРЖАНИЕ/CONTENTS

ФИЗИОЛОГИЯ

А. А. ЖАБИНСКАЯ

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ КРЫСЯТ В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ В МОДЕЛИ ФЕБРИЛЬНЫХ СУДОРОГ И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИНУЛИНА В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

6

PHYSIOLOGY

A. A. ZHABINSKAYA

FEATURES OF BEHAVIOR CHANGES IN RATS IN THE OPEN FIELD IN A MODEL OF FEBRILE SEIZURES AND DURING INULIN CONSUMPTION IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Ж. А. ГЛАДКОВА, Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Е. В. ФЁДОРОВА, С. Г. ПАШКЕВИЧ, Г. П. МИРОНОВА, С. В. МАНЬКОВСКАЯ

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫС С ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ УЧАСТОК ГЕНА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА

12

ZH. A. HLADKOVA, T.E. KUZNETSOVA, E. V. FEDOROVA, S. G. PASHKEVICH, G. P. MIRONOVA, S. V. MANKOVSKAYA

MORPHOMETRIC CHANGES IN THE RAT PRIMARY SOMATOSENSORY CORTEX WITH CEREBRAL ISCHEMIA AFTER INTRODUCTION OF A VECTOR CONSTRUCT CONTAINING A SECTION OF THE BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE

И. П. ЖАВОРОНОК, С. В. МАНЬКОВСКАЯ, Н. И. СЧАСТНАЯ, О. А. АНТИПОВА, Т. А. ФИЛИПОВИЧ, Е. В. ФЁДОРОВА, Н. А. РОГОВОЙ, С. А. АЛЕКСЕЕВ

КРИТИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫСЫ: ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ

18

I. P. ZHAVORONOK, S. V. MANKOVSKAYA, N. I. SHCHASTNAYA, O. A. ANTIPOVA, T. A. FILIPOVICH, E. V. FIODOROVA, N. A. ROGOVOY, S. A. ALEKSEEV

CRITICAL ISCHEMIA OF THE RAT HIND LIMB: PATHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE MODEL

А. А. БАСАЛАЙ

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЖИРОВОГО РАЦИОНА ПИТАНИЯ САМОК КРЫС ВИСТАР НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИХ ПОТОМСТВА МУЖСКОГО ПОЛА

25

A. A. BASALAI

EFFECT OF HIGH-FAT DIET OF FEMALE WISTAR RATS ON BEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF THEIR MALE OFFSPRING

Ф. И. ВИСМОНТ, С. Н. ЧЕПЕЛЕВ, С. В. ГУБКИН, П. Ф. ЮШКЕВИЧ, Е. Н. ЧЕПЕЛЕВА

О ЗНАЧИМОСТИ АКТИВНОСТИ М-ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ В РЕАЛИЗАЦИИ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

31

F. I. VISMONT, S. N. CHEPELEV, S. V. GOUBKIN, P. F. JUSHKEVICH, E. N. CHEPELEVA

ON THE SIGNIFICANCE OF THE ACTIVITY OF M-CHOLINOREACTIVE SYSTEMS IN THE IMPLEMENTATION OF THE INFARCTION-LIMITING EFFECT OF POSTCONDITIONING WITH L-LACTATE IN MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN YOUNG AND OLD RATS

Д. В. ЛУЦКОВИЧ, А-М. В. ЕРОФЕЕВА, М. А. КОРНЕЕВА, А. В. КЛЫЧ, С. В. МАНЬКОВСКАЯ, А. Н. МЕЛЕШКО

СИНГЕННАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

40

D. V. LUTSKOVICH, A-M. V. EROFEEVA, M. A. KORNEEVA, H. V. KLYCH, S. V. MANKOVSKAYA, A. N. MELESHKO

SYNGENIC MODEL OF NEUROBLASTOMA

О. Е. ПОЛУЛЯХ, Т. А. МИТЮКОВА, Е. Ф. ПОЛУКОШКО, Т. И. ТЕРПИНСКАЯ

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ АСТРОЦИТОВ В МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ ВИРУСНОГО ГЕНЕЗА

47

O. Y. POLULIAKH, T. A. MITYUKOVA, Y. F. POLUKOSHKO, T. I. TERPINSKAYA

INDICATORS OF THE FUNCTIONAL STATE OF ASTROCYTES IN THE MODEL OF INFLAMMATION OF VIRAL GENESIS

Ю. Н. ВОРОНИК, А. В. КИТУРКО

СТРУКТУРНЫЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ И ТОЩЕЙ КИШОК У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХОЛЕСТАЗА МАТЕРИ

53

Y. N. VORONIK, A. V. KITURKO

STRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL PARAMETERS OF THE DUODENUM AND JEJUNUM IN NEWBORN RATS DEVELOPED UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL MATERNAL CHOLESTASIS

Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ, А. А. ЖАБИНСКАЯ, А. В. ЧУПРИНА, В. В. СОЛТАНОВ

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* И *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* НА РАЗВИТИЕ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

59

T. B. MELIK-KASUMOV, A. A. ZHABINSKAYA, A. V. CHUPRINA, V. V. SOLTANOV

EFFECTS OF PROBIOTIC BACTERIA *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* AND *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* ON THE DEVELOPMENT OF PENTYLENETETRAZOLE MODEL OF EPILEPSY

*Р. Н. ЯСЮЧЕНЯ, С. Б. КОНДРАШОВА, А. С. ХОЛОЛОВИЧ,
Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ*

**МИНЕРАЛЬНЫЙ СТАТУС КРЫС ПРИ
АЛИМЕНТАРНОМ ОЖИРЕНИИ**

МОРФОЛОГИЯ

*М. В. ДМИТРИЕВА, В. В. САВОШ, З. Н. БРАГИНА,
С. Н. РЯБЦЕВА, Т. А. ЛЕТКОВСКАЯ*

**СТРУКТУРА И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ С
МЕЗАНГИОКАПИЛЛЯРНЫМ КЛУБОЧКОВЫМ
ПОВРЕЖДЕНИЕМ**

*Т. В. КЛИМУТЬ, А. В. ЗАЕРКО, С. В. ЕМЕЛЬЯНЧИК,
С. М. ЗИМАТКИН*

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ
ПОЯСНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ**

БИОХИМИЯ

О. В. ТИТКО, Н. П. КАНУННИКОВА, Д. С. СЕМЕНОВИЧ

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ
ХАНТИНГТОНА И ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ
ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ**

*А. А. ЧИРКИН, П. Ю. ПИНЧУК, М. В. ВИШНЕВСКАЯ,
О. М. БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ
МОЛЛЮСКОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА
ВЕЩЕСТВ**

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. В. ДАВЫДОВ, С. В. ЖАВОРОНОК

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ ВИРУСА
ГЕПАТИТА Е К ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ ХОЗЯИНА**

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

*Т. В. РУДЕНКОВА, С. А. КОСТЮК, М. В. ШТОНДА,
Т. В. АКОЛА*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ,
АССОЦИИРОВАННЫЕ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У
ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И
ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА**

ФИЗИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА И КУРОРТНАЯ ТЕРАПИЯ

*Н. Д. ТИТКОВА, С. В. ГУБКИН, С. Б. КОХАН,
О. Е. ПОЛУЛЯХ, С. В. МИХАЛЬЧИК, В. В. КОРОТКИЙ*

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОЗДОРОВЛЕНИЯ САНАТОРНО-
КУРОРТНОЙ МЕСТНОСТИ НА ОТДЫХАЮЩИХ В ДУП
«САНАТОРИЙ КРИНИЦА»**

*Н. Д. ТИТКОВА, С. В. ГУБКИН, С. А. ГЕЛАХОВ,
Э. С. КАШИЦКИЙ¹*

**МЕТЕОЗАВИМОСТЬ В САНАТОРНО-КУРОРТНЫХ
УСЛОВИЯХ**

66

*R. N. YASYUCHENYA, A. S. KHOLOLOVICH,
S. B. KONDRASHOVA, T. B. MELIK-KASUMOV*

**MINERAL STATUS OF RATS WITH NUTRITIONAL
OBESITY**

MORPHOLOGY

71

*M. V. DMITRIEVA, V. V. SAVOSH, Z. N. BRAGINA,
S. N. RJABCEVA, T. A. LETKOVSKAJA*

**STRUCTURE AND MORPHOLOGICAL
CHARACTERISTICS OF GLOMERULONEPHRITIS
WITH MESANGIOCAPILLARY GLOMERULAR
PATTERN**

75

*T. V. KLIMUT, A. V. ZAERKO, S. V. EMELYANCHIK,
S. M. ZIMATKIN*

**HISTOLOGICAL CHANGES IN THE NEURONS OF THE
RAT CINGULATE CORTEX DURING CHOLESTASIS**

BIOCHEMISTRY

84

O. V. TITKO, N. P. KANUNNIKOVA, D. S. SEMENOVICH

**CHANGES IN PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS
AND ENERGY METABOLISM IN RATS IN AN
EXPERIMENTAL MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE
AND THE EFFECT OF PANTOTHENIC ACID
DERIVATIVES**

90

*A. A. CHIRKIN, P. YU. PINCHUK, M. V. VISHNEVSKAYA,
O. M. BALAEVA-TIKHOMIROVA*

**USE OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSKS FOR
STUDYING METABOLIC DISORDERS**

MICROBIOLOGY

98

V. V. DAVYDOV, S. V. ZHAVORONOK

**GENETIC MARKERS OF HEPATITIS E VIRUS
ADAPTATION TO THE HOST'S INTRACELLULAR
ENVIRONMENT**

BIOMEDICAL TECHNOLOGY

106

*T. V. RUDENKOVA, S. A. KOSTIUK, M. V. SHTONDA,
T. V. AKOLA*

**MOLECULAR GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH
THE RISK OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS IN
PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND
OVERWEIGHT**

PHYSICAL MEDICINE AND SPA THERAPY

115

*N. D. TSITKOVA, S. V. GOUBKIN, S. B. KOHAN,
O. Y. POLULIAKH, S. V. MIKHALCHIK, V. V. KOROTKIY*

**INFLUENCE OF HEALTH IMPROVEMENT FACTORS
OF THE SANATORIUM RESORT AREA ON
VACATIONERS IN SUE SANATORIUM «KRINITSA»**

119

*N. D. TSITKOVA, S. V. GOUBKIN, S. A. GELAKHOV,
E. S. KASHITSKIY*

**WEATHER RESISTANCE IN SANATORIUM-RESORT
CONDITIONS**

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

А. О. КОЛОМИЕЦ, Л. В. БАТУРЕВИЧ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОКРАШИВАНИЯ ЭЯКУЛЯТА

К. Н. И. ИЛЪЯС

THE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF DYSLIPIDEMIA IN T2DM DIABETES PATIENTS

Е. В. ЛЕМЕШКО, А. И. ШАРКО

АНДРОГЕННАЯ АЛОПЕЦИЯ У ЖЕНЩИН: ПАТОГЕНЕЗ И РОЛЬ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

ОТ РЕДАКЦИИ

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

REVIEW AND PROBLEM ARTICLES

124 *A. O. KOLOMIETS, L. V. BATUREVICH*

COMPARATIVE ANALYSIS OF EJACULATE STAINING METHODS

130 *И. Х. Х. ИЛЪЯС*

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДИСЛИПИДЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

137 *Y. V. LEMESHKO, A. I. SHARKO*

ANDROGENIC ALOPECIA IN WOMEN: PATHOGENESIS AND ROLE OF INSULIN RESISTANCE

EDITORIAL NOTES

146 INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

А. А. ЖАБИНСКАЯ

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ КРЫСЯТ В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ В МОДЕЛИ ФЕБРИЛЬНЫХ СУДОРОГ И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИНУЛИНА В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Проведены исследования изменений поведения в открытом поле у крысят в возрасте 26-ти и 33-х суток отроду в норме, в условиях модели фебрильных судорог и потребления пребиотика инулина. Установлено, что у здоровых крысят в этом возрасте происходит снижение локомоторной активности в тесте при его повторном прохождении. Развитие модели фебрильных судорог приводит к росту показателя тревожности – длительности груминга. Применение инулина приводит к более высокой исследовательской (вертикальные стойки) и эмоциональной (груминг и движение на месте) активности при первом прохождении теста только у здоровых животных, а в условиях модели фебрильных судорог несколько ослабляет характерное нарастание показателя тревожности при повторном прохождении теста. Полученные результаты позволяют заключить, что потребление инулина в ранний постнатальный период в разной степени позитивно сказывается на показателях исследовательского и эмоционального поведения в норме и в условиях модели фебрильных судорог.

Ключевые слова: фебрильные судороги, инулин, двигательная активность, исследовательская активность, эмоциональная активность.

Введение. Фебрильные судороги (ФС) являются одним из самых распространенных судорожных состояний в детском возрасте [7]. От 2 % до 5 % детей сталкиваются с данным типом судорог [21]. Фебрильные судороги – это эпизоды судорожных припадков, которые возникают при повышении температуры тела выше 38,0°С у детей в возрасте от 6 месяцев до 5 лет. При этом данный тип судорожных приступов не связан с инфекциями центральной нервной системы [8, 20, 21]. Повторные ФС отмечаются у 30 % детей, в третий раз фебрильный приступ отмечается в 15 % случаев [19]. Примерно у 1–2 % детей с простыми фебрильными припадками впоследствии отмечается развитие эпилепсии. У детей со сложными фебрильными судорогами, аномальным развитием нервной системы или с эпилепсией в семейном анамнезе более высокий риск развития последующей эпилепсии – примерно 5–10 % [14]. У большинства пациентов первопричиной повышения температуры, которая ведет к развитию фебрильных судорог, являются различные инфекции [20]. Среди таких инфекций можно выделить вирус гриппа, аденовирусы, ротавирусы, энтеровирусы [3]. Однако наиболее распространенной причиной повышения температуры, которая ведет к появлению фебрильных судорог, является вирус герпеса человека 6 и 7 типа [1, 3, 20]. Механизмы, которые приводят к нарушению развития нервной системы или эпилепсии как следствие ФС, остаются малоизученными. Исходя из этого остается актуальным исследование того, как различные воздействия могут влиять на развитие и течение фебрильных судорог и их последствия.

В последнее время становится актуальным изучение влияния кишечной микробиоты на различные системы организма, в особенности на нервную систему [2, 22]. Была выявлена тесная связь между различными неврологическими патологиями и состоянием кишечной микробиоты [4, 23]. В частности, развитие кишечного дисбиоза оказывает существенное влияние на развитие аутизма и эпилепсии, дебют которых характерен для детского возраста [13, 17]. В связи с этим важно изучить влияние факторов, которые могут положительно влиять на кишечную микробиоту, особенно в период активного роста и развития организма. В контексте изучения эффектов фебрильных судорог важно помнить, что тяжелое течение инфекционных заболеваний в детском возрасте часто сопровождается длительным применением антибиотиков, которые способны нарушить баланс кишечной микробиоты [15]. Эти нарушения в особенности могут быть судьбоносны в детском возрасте, так как в этот период постнатального развития происходит параллельное развитие как кишечной микробиоты, так и регуляторных систем организма, прежде всего нервной системы.

Одним из способов позитивного влияния на состав кишечной микробиоты является применение пребиотиков. Пребиотики представляют собой неперевариваемые пищевые компоненты, которые могут избирательно стимулировать рост и/или активность полезных для организма (пробиотических) групп бактерий в толстом кишечнике [6, 12, 18]. Одним из самых распространенных пребиотиков является инулин. Он представляет собой полисахарид, состоящий из остатков фруктозы, связанных β 1,2-гликозидной связью, который хорошо ферментируется кишечной микробиотой с образованием короткоцепочечных жирных кислот [12]. В систематическом обзоре, было показано, что применение инулина оказывает положительное влияние не только на бифидобактерии, но и на другие пробиотические микроорганизмы, такие как лактобациллы и *Faecalibacterium prausnitzii* [11].

Целью настоящего исследования было изучить влияние инулина на свободное поведение животных в тесте «открытое поле» как у здоровых животных, так и после перенесенных в более раннем возрасте фебрильных судорог.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на 29 крысах Wistar в возрасте 10–33-х суток (P10–P33). Для развития модели фебрильных судорог (ФС) применяли длительную гипертермию [5,9]. Гипертермию развивали у крысят в возрасте P10–P11 при помощи направленного потока горячего воздуха с температурой 43–45°C. Глубокую температуру тела крысят контролировали каждые две минуты ректально. Температуру потока воздуха и глубокую температуру измеряли с помощью программно-аппаратного комплекса Pico Logger (Pico Technology, Великобритания) с использованием гибких термодпар с диаметром 1 мм. Гипертермию фиксировали при достижении глубокой температуры тела 41°C, в этих условиях крысята находились в течение 30-и минут. При перегреве крысят выше 43°C их на 20 секунд убрали из-под потока горячего воздуха на прохладную поверхность. В течение гипертермии регистрировали клонические судороги: при их продолжительности не менее 15-и минут модель считали развившейся. По окончании 30-и минут гипертермии животных убрали из условий повышенной температуры до полного прекращения судорог и возвращения глубокой температуры к первоначальным значениям (35–36°C), после чего возвращали в клетку к кормящей самке. Контрольные группы подвергались тем же воздействиям без включения потока горячего воздуха. Начиная со следующих суток после моделирования фебрильных судорог крысят ежедневно поили раствором инулина (Beneo GmbH, Германия) в дозе 1 г/кг до конца эксперимента (возраст P33). Контрольные группы получали в течение этого времени аналогичный объем воды.

Тест «Открытое поле», позволяющий оценить пространственную ориентацию, двигательную и исследовательскую активность экспериментальных животных, проводили в возрасте P26 и P33, то есть через 14 и 21 суток после моделирования фебрильных судорог соответственно. Животное помещали в центр круглой арены диаметром 1,2 м и в течение 5 минут проводили видеорегистрацию его поведения. Далее полученные видеозаписи анализировали при помощи программы Field4 (ИЭФБ РАН, Россия), в которой фиксировали количество и длительность поведенческих актов. Для получения схем перемещения репрезентативных животных была использована программа «Круг и крест» (ИЭФБ РАН, Россия). Эксперименты проведены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986, в редакции 2005 года). Дизайн исследования одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол №1 от 26.01.2023 г.). Статистический анализ проводили в программе Statistica 10. Для оценки изменений в группах при повторном проведении теста «Открытое поле» использовали парный критерий Уилкоксона. Для сравнения показателей между группами использовали критерий Краскела-Уоллиса, попарные сравнения проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q₂₅%;Q₇₅%)). Критический уровень значимости (*p*) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. Результаты по наиболее информативным показателям поведения крыс в открытом поле представлены на рисунке 1. Для всех групп животных была отмечена общая тенденция к уменьшению длительности вертикальных стоек во время пребывания в открытом поле (рисунок 1, А). Тем не менее, достоверными эти изменения оказались только в случае группы «Инулин» (*p*=0,014). Здесь важно отметить, что этот показатель в группе (4,2 (2,7;7,8) с) был значительно выше контрольных значений (1,9 (1,4;2,3) с; в 2,2 раза; *p*=0,006) только при первом проведении теста в возрасте P26, тогда как при повторном тесте в возрасте P33 значения не отличались от контрольных. Таким образом, потребление инулина с раннего возраста приводило к

более высокой вертикальной двигательной активности при первом прохождении теста, что может характеризовать более высокий интерес к новому пространству. Вместе с тем, развитие модели фебрильных судорог приводило к нивелированию этого эффекта инулина.

Согласно результатам, представленным на рисунке 1, Б, потребление инулина как у здоровых крысят, так и после моделирования фебрильных судорог, приводило к повышению эмоциональной активности, что выражалось в большем количестве актов груминга при первом прохождении теста по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе количество актов груминга составило 4 (3;5), в группе «Инулин» – 8 (6,5;8,5) ($p=0,06$), в группе «ФС+Инулин» – 6,5 (4;10) ($p=0,016$).

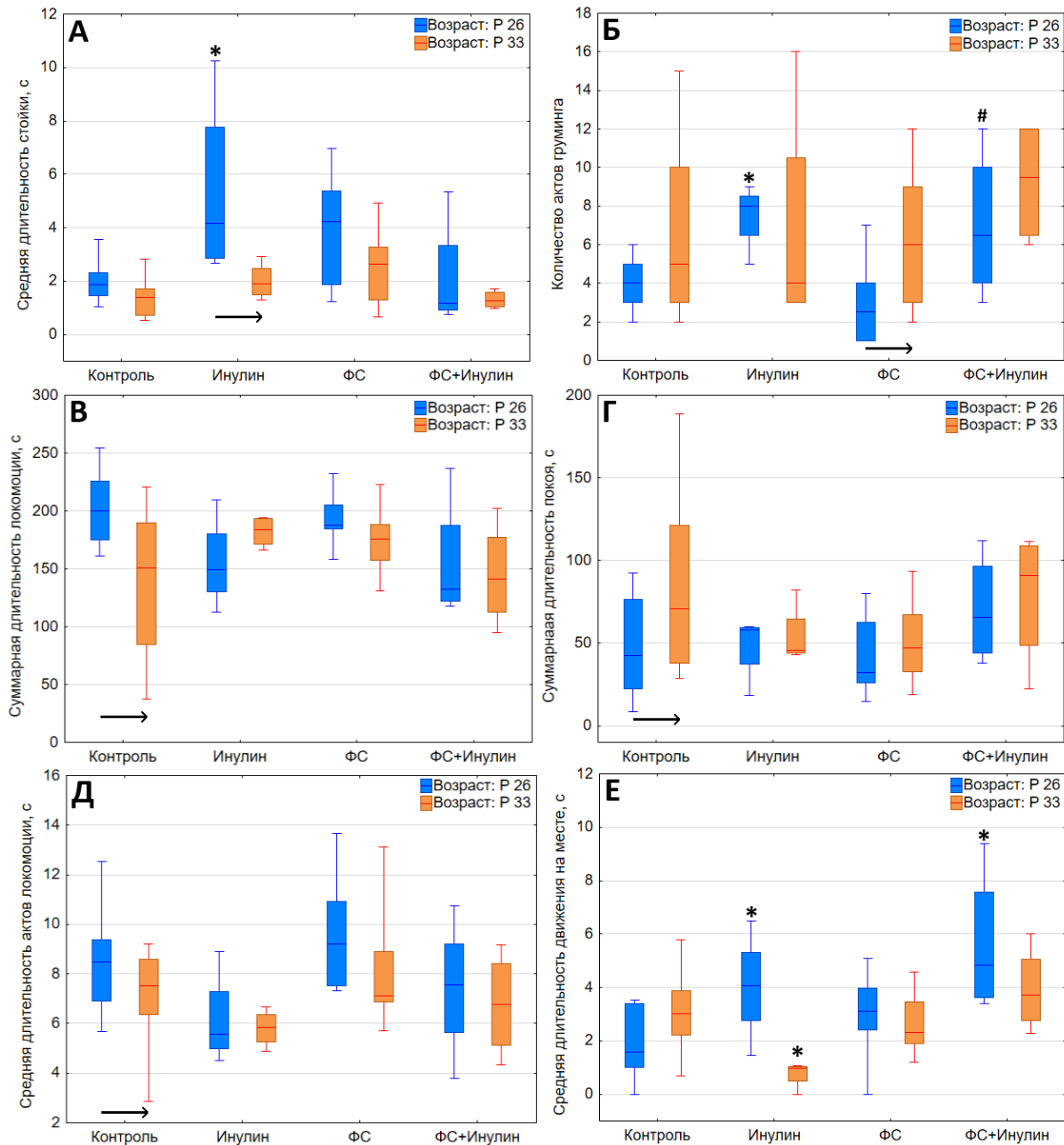


Рис. 1. Основные показатели двигательной активности крысят различных экспериментальных групп в открытом поле в возрасте P26 и P33

Примечание: → – достоверное изменение с возрастом ($p<0,05$); * – $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой; # – $p<0,05$ по сравнению с группой «ФС»

Как в контрольной группе, так и при различных воздействиях увеличения количества актов груминга с возрастом не происходило. При этом развитие модели фебрильных судорог в более раннем возрасте сказывалось на динамике этого показателя эмоциональной активности – происходило его увеличение с 2,5 (1;4) до 6 (3;9) ($p=0,005$) при попарном сравнении индивидуальных значений. Другой показатель, который в тесте можно использовать для оценки эмоциональной

активности животных – длительность движения на месте. Данный показатель включает повороты вокруг себя и выступ только передними лапами с вытягиванием тела вперед (англ. *stretch attend posture*) [10]. При анализе этого показателя значимые отличия от контрольной группы были также обнаружены для крыс, получавших инулин вне зависимости от наличия или отсутствия модели фебрильных судорог (рисунок 1, Е). В отсутствие модели медианное значение показателя – 4,1 (2,8;5,3) с, что было в 2,6 раза выше контроля (1,6 (1,0;3,4) с; $p=0,04$), а в условиях модели ФС (4,8 (3,6;7,6) с) – в 3 раза выше ($p=0,006$). При повторном проведении теста в возрасте P33 в случае здоровых животных показатель снижался (1,0 (0,5;1,5) с), становясь ниже аналогичных контрольных значений в 3 раза (3,0 (2,2;3,9) с; $p=0,01$). Таким образом, применение инулина приводило к повышенной эмоциональной активности только при первом прохождении теста, то есть в условиях новизны, тогда как развитие модели фебрильных судорог приводило к повышению группы показателей при повторном предъявлении, что может говорить о влиянии перенесенных в раннем возрасте фебрильных судорог на повышенную тревожность при нахождении в уже знакомом месте. В случае применения инулина у здоровых животных, напротив, уменьшение длительности движения на месте может говорить о более низкой тревожности животных при повторном применении теста.

При анализе локомоторной активности было установлено, что ее снижение при повторном применении теста происходит только у здоровых животных, не получавших инулин. Это выражалось в уменьшении суммарной длительности локомоции в 2 раза (рисунок 1, В, $p=0,003$), средней длительности отдельных актов передвижения на 11 % (рисунок 1, Д, $p=0,02$) и в увеличении суммарной длительности покоя на 40 % (рисунок 1, Г, $p=0,008$). На рисунке 2 представлены схемы движения в открытом поле в ходе конкретного эксперимента для отдельных репрезентативных крыс из групп «Контроль» и «Инулин» (для сравнения).

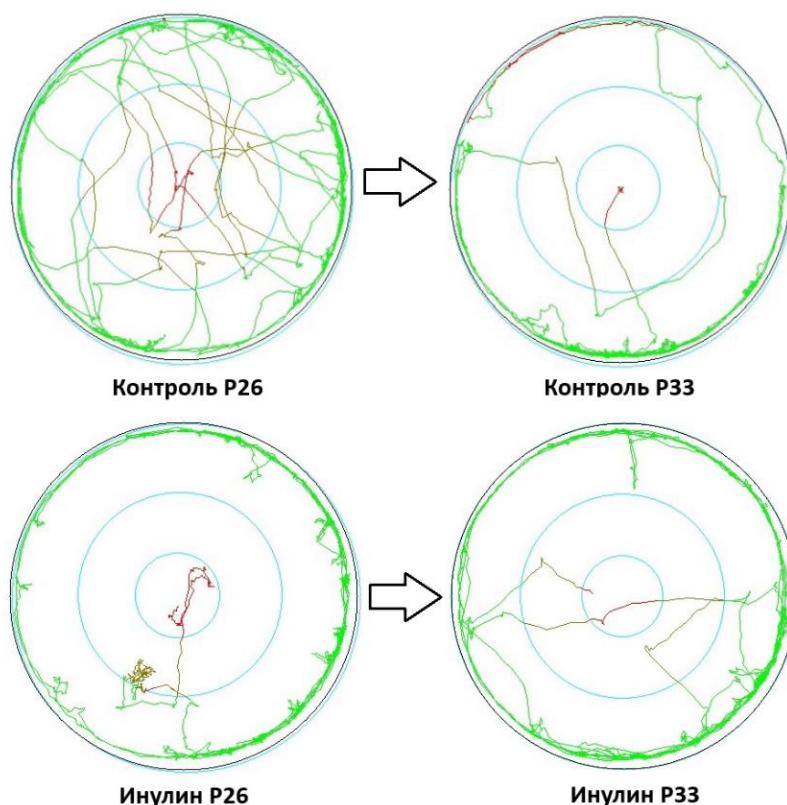


Рис. 2. Изменение с возрастом схем перемещения отдельных крыс с репрезентативными показателями в группе «Контроль» и «Инулин»

Снижение локомоторной активности контрольных животных описано нами ранее для взрослых крыс [16]. По совокупности представленных данных отсутствие таких изменений у здоровых крысят, получавших инулин, можно связать с его влиянием на эмоциональную и исследовательскую активность, а у крысят с моделью фебрильных судорог – с влиянием модели на общую тревожность животных.

Заключение. Результаты исследования указывают на то, что потребление инулина с раннего возраста приводит к повышению исследовательской и эмоциональной активности у здоровых крысят

в условиях помещения в новое пространство. При этом повторное помещение в это же пространство через неделю приводит к снижению одного из показателей тревожности ниже контрольных значений. Таким образом, потребление инулина на раннем этапе постнатального развития, вероятно, способствует усилению двух ключевых доминант в поведении молодого организма – любопытства и осторожности в новых условиях. Отсутствие характерного для контрольных животных снижения локомоторной активности при повторном прохождении теста здесь также можно объяснить все еще высоким, хоть и снижающимся, интересом к пространству открытого поля.

Развитие модели фебрильных судорог в возрасте 10–11 суток приводит к росту показателя тревожности крысят в открытом пространстве при его повторном предъявлении, что не характерно для здоровых животных и указывает на дисбаланс базовых эмоциональных реакций в условиях важнейшего этапа индивидуального развития. При этом потребление инулина не сказывается на основных показателях исследовательской активности, но модулирует эмоциональные реакции крысят в условиях стресса.

Полученные результаты позволяют заключить, что потребление инулина в ранний постнатальный период в различной степени позитивно сказывается на показателях исследовательского и эмоционального поведения в норме и в условиях модели фебрильных судорог.

Литература:

- [1] Орлова С.В., Стома И.О., Шмелева Н.П., Сивец Н.В. Современное состояние проблемы герпесвирусных инфекций 6-го и 7-го типов с разными клиническими формами, возможности лечения // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2021. № 10. С. 78–86.
- [2] Agirman G., Yu K., Hsiao E. Signaling inflammation across the gut-brain axis // Science. 2021. Vol. 374. P. 1087–1092.
- [3] Alekseeva L., Zheleznikova G., Gorelik E., Skripchenko N., Zhirkov A. Cytokines and neuro-specific proteins in viral encephalitis and convulsive syndrome in children. II. Convulsive syndrome // Russian Journal of Infection and Immunity. 2021. Vol. 11. P. 433–446.
- [4] Amlerova J., Šroubek J., Angelucci F., Hort J. Evidences for a Role of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Epilepsy // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22. P. 5576.
- [5] Bender R., Dubé C., Baram T. Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model // Adv Exp Med Biol. 2004. Vol. 548. P. 213–225.
- [6] Chudzik A., Orzyłowska A., Rola R., Stanisław G.J. Probiotics, Prebiotics and Postbiotics on Mitigation of Depression Symptoms: Modulation of the Brain-Gut-Microbiome Axis // Biomolecules. 2021. Vol. 11. P. 1000.
- [7] Crespo M., León-Navarro A., Martín M. Hyperthermia-induced seizures during neonatal period alter the functionality of A1 and A2A receptors in the cerebellum and evoke fine motor impairment and gait disturbances in adult rats // Physiol Behav. 2021. Vol. 240. P. 113543.
- [8] Eilbert W., Chan C. Febrile seizures: A review // J. Am Coll Emerg Physicians Open. 2022. Vol. 3. P. e12769.
- [9] Griflyuk A., Postnikova T., Malkin S., Zaitsev A. Alterations in Rat Hippocampal Glutamatergic System Properties after Prolonged Febrile Seizures // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. P. 16875.
- [10] Holly K., Orndorff C., Murray T. An automated analysis of stretch-attend posture in rodent behavioral experiments // Sci Rep. 2016. Vol. 6. P. 31286.
- [11] Hughes R., Alvarado D., Swanson K., Holscher H. The Prebiotic Potential of Inulin-Type Fructans: A Systematic Review // Adv Nutr. 2022. Vol. 13. P. 492–529.
- [12] Le Bastard Q., Chapelet G., Javaudin F., Lepelletier D., Batard E., Montassier E. The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020. Vol. 39. P. 403–413.
- [13] Lee K., Kim N., Shim J.O., Kim G.-H. Gut Bacterial Dysbiosis in Children with Intractable Epilepsy // J Clin Med. 2020. Vol. 10. P. 5.
- [14] Lee S., Byeon J., Kim G., Eun B.-L., Eun S.-H. Epilepsy in children with a history of febrile seizures // Korean J Pediatr. 2016. Vol. 59, 2. P. 74–79.
- [15] McDonnell L. et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis // Gut Microbes. Vol. 13. P. 1–18.
- [16] Melik-Kasumov T., Korneyeva M., Chuprina A., Zhabinskaya A., Rozhko A. Neuroprotective Effect of Palmitoylethanolamide in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2022. Vol. 58. P. 448–456.
- [17] Mulle J., Sharp W., Cubells J. The gut microbiome: a new frontier in autism research // Curr Psychiatry Rep. Vol. 15. P. 337.
- [18] Patel S., Goyal A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review // 3 Biotech. Vol. 2. P. 115–125.
- [19] Renda R., Yüksel D., Gürer Y.K.Y. Evaluation of Patients With Febrile Seizure: Risk Factors, Recurrence, Treatment and Prognosis // Pediatr Emerg Care. 2020. Vol. 36. P. 173–177.
- [20] Sawires R., Buttery J., Fahey M. A Review of Febrile Seizures: Recent Advances in Understanding of Febrile Seizure Pathophysiology and Commonly Implicated Viral Triggers // Front Pediatr. 2021. Vol. 9. P. 801321.

- [21] Syndi D., Pellock M. Recent Research on Febrile Seizures: A Review // J. Neurol Neurophysiol. 2013. Vol. 4. P. 19519.
[22] Wang Q., Yang Q., Liu X. The microbiota-gut-brain axis and neurodevelopmental disorders // Protein Cell. 2023. Vol. 14. P. 762–775.
[23] Warner B.B. The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders // Pediatr Res. 2019. Vol. 85. P. 216–224.

A. A. ZHABINSKAYA

FEATURES OF BEHAVIOR CHANGES IN RATS IN THE OPEN FIELD IN A MODEL OF FEBRILE SEIZURES AND DURING INULIN CONSUMPTION IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD

State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

Behavioral changes in the open field test were studied in rat pups on postnatal days 26 and 33 in health, in the model of febrile seizure and during daily inulin consumption. It was established that healthy rat pups of this age decrease their locomotor activity during the second test. It was also shown that the development of the febrile seizure model led to increase in anxiety parameter – grooming. Also, inulin consumption in healthy rat pups led to increase in exploration and emotional activity during first test, and decrease anxiogenic effect of the model during the second test. The results obtained allow us to conclude that inulin consumption during early postnatal development has a positive effect to varying degrees on the exploration and emotional behavior in health and in the model of febrile seizure.

Key words: febrile seizures, inulin, locomotor activity, exploration activity, emotional activity.

УДК 612.82: 616-005.4

Ж. А. ГЛАДКОВА, Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Е. В. ФЁДОРОВА, С. Г. ПАШКЕВИЧ,
Г. П. МИРОНОВА, С. В. МАНЬКОВСКАЯ

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫС С ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ УЧАСТОК ГЕНА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА

*Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук
Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Высокая степень инвалидизации и летальность актуализируют поиски новых способов профилактики и лечения инсультов. Представляется перспективным изучение влияния субстанций, направленных на восстановление нейронов в раннем постинсультном периоде. В статье обсуждаются морфо-гистохимические изменения при моделировании ишемического инсульта, в том числе и гендерные различия в восстановлении поврежденных участков головного мозга крыс, после однократного внутрицентрального введения нейротрофического фактора мозга, связанного с аденоассоциированным вирусным вектором.

Ключевые слова: головной мозг крыс, ишемический инсульт, внутрицентральное введение, биологическая терапия.

Введение. Согласно данным литературы, в мире ежегодно регистрируется около 10 млн случаев инсульта. Инсульт является патологическим состоянием, которое проявляется острым нарушением мозгового кровообращения и характеризуется внезапным появлением очаговой неврологической симптоматики. Прогноз выживаемости, степень инвалидизации зависят от вида инсульта, локализации, пола, возраста пациента [1]. Различают геморрагический и ишемический инсульт, который составляет примерно 80 % всех случаев зарегистрированных инсультов.

Распространенным последствием ишемического инсульта является повреждение структур соматосенсорной системы головного мозга: цитотоксическое воздействие большого количества глутамата и нейрокининов не только изменяет механизмы слаженного регулирования возбудимости центральных ноцицептивных нейронов, но и приводит к их гибели. Развивается центральная невропатическая боль, которая, в свою очередь, сопровождается усилением возбудимости и реактивности ноцицептивных нейронов в дорсальном роге спинного мозга, таламических ядрах и соматосенсорной коре конечного мозга [2, 3].

При изучении последствий повреждений и поиске новых способов лечения инсульта исследователи делают акцент на восстановлении клеток зоны пенумбры (ишемическая полутень): участка ишемического обратимого поражения, в которой объемный мозговой кровоток снижен до уровня достаточного лишь для минимального поддержания жизнеспособности нейронов на уровне сохранения целостности клетки, однако синаптическая активность их подавлена. Снижение энергетического метаболизма и активности нейронов приводят к тому, что использование своевременной адекватной терапии у пациентов возможно восстановить нормальное функционирование клеток в поврежденной области и уменьшить область постинсультного поражения головного мозга [4, 5].

Создание и использование генных и клеточных технологий позволили определить новое направление в лечении и профилактике инсульта. Применение генной терапии, обеспечивающей поддержание жизнедеятельности поврежденных нейронов и восстановление синаптической передачи за счет безопасного стимулирования процессов нейрорегенерации, включает как гены, кодирующие нейротрофические факторы, антиапоптозные белки, белки теплового шока и др., так и комбинации нескольких нейротрофических факторов.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (рААВ) являются одними из наиболее перспективных векторов доставки для генной терапии благодаря своим непатогенным свойствам,

низкой иммуногенности со стороны хозяина и тропности к большинству клеток и тканей [6]. Генетическая конструкция, представляющая собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус 1-ого серотипа (pAAB1) и содержащая участок гена *BDNF* (от англ. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*; нейротрофический фактор мозга) предоставлена для проведения исследований компанией VectorBuilder (США). Известно, что нейротрофический фактор мозга – это белок, относящийся к нейротрофинам, – веществам, стимулирующим и поддерживающим развитие нейронов [7].

Целью исследования явилось изучение гистоструктурных и метаболических изменений первичной соматосенсорной коры крыс после моделирования ишемического инсульта и последующего однократного внутрицентрального введения генетической конструкции pAAB1-*BDNF*.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на крысах Вистар (24 самца и 24 самки) массой 280 ± 20 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты. Все эксперименты проведены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [8] и одобрены Комитетом по биоэтике Института физиологии (протокол № 2 от 21.02.2022 г.). В качестве контроля животным с ишемией внутрицентрально однократно вводили искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ, Tocris Bioscience, United Kingdom), в качестве тестируемой субстанции для проведения терапии однократно внутрицентрально вводили генетическую конструкцию pAAV1-*BDNF* (AAVR15).

Животных разделили на группы: 1-я группа – интактный контроль (самцы, $n=6$), 2-я группа – контроль (ишемия+ИСМЖ, самцы, $n=9$), 3-я группа – ишемия+AAVR15 (самцы, $n=9$), 4-я группа – интактный контроль (самки, $n=6$), 5-я группа – контроль (ишемия+ИСМЖ, самки, $n=9$), 6-я группа – ишемия+AAVR15 (самки, $n=9$). Была выбрана модель ишемического инсульта, которая которую детектировали в области первичной соматосенсорной коры больших полушарий и формировали следующим образом. Крыс наркотизировали внутривенно (30 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана). Моделирование ишемического повреждения головного мозга осуществляли согласно методикам; E. Z. Longa et al., 1989, Y. Wang-Fischer, 2009. Далее кожную рану ушивали (ПГА, USP 3/0, Фиатос, РФ). Через 15 минут после индукции ишемии в область большой цистерны мозга с помощью шприцевого насоса (ДШ-10, РФ) однократно вводили 50 мкл ИСМЖ (2-я и 5-я группа) или 50 мкл раствора AAVR15 в дозе 5×10^{11} вг со скоростью 10 мкл/мин с последующей задержкой в месте инъекции на 10 мин (3-я и 6-я группа).

На 21-е сутки по 3 особи из каждой группы выводили из эксперимента ($n=18$) и проводили забор образцов головного мозга для морфологического исследования. На 42-е сутки оставшиеся животные из каждой группы были выведены из эксперимента ($n=30$), также были взяты образцы головного мозга. С помощью слайсера (Kent Scientific Corporation, USA) вырезали корональные срезы толщиной 3 мм на расстоянии 2, 5, 8 и 11 мм от лобного полюса. Срез от 5 до 8 мм (bregma от 1,0 до -2,0 мм), включающий основную часть ишемического поражения, быстро замораживали для дальнейших анализов. Соседние срезы от 2 до 5 мм (bregma от 4,0 до 1,0 мм спереди) и 8 и 11 мм (bregma от -2,0 до -5,0 мм сзади) использовались для характеристики всей зоны инфаркта («ядра» инсульта и зоны пенумбры) [9].

После заморозки образцов (-20°C) из срезов мозга толщиной 3 мм в криомикротоме (MicromGmbH, Germany) вырезали срезы толщиной 20 мкм и 10 мкм, затем переносили их на предметные стекла, покрытые силаном. Срезы толщиной 20 мкм окрашивали на активность ферментов; срезы толщиной 10 мкм окрашивали толудиновым синим по Нисслю. Исследование микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа, оснащенного цифровой фотокамерой (Альтами LUM-1, РФ). Оцифрованные изображения обрабатывали с помощью программы Image J. (National Institutes of Health, USA). Измерение активности ферментов и морфометрию гистологических препаратов проводили в нейронах, подсчитанных в 10-ти полях зрения при увеличении $400\times$. Активность ферментов оценивали по оптической плотности продукта реакции в цитоплазме нейронов, выражая результаты в условных единицах оптической плотности.

Данные о средней плотности расположения нейронов в поле зрения получали в результате морфометрического исследования препаратов, окрашенных по методу Ниссля. Индекс нейродегенерации (ИНД) рассчитывали по отношению числа нейронов с грубыми нарушениями структуры к числу неизмененных нервных клеток.

Учитывая, что ферменты углеводно-энергетического обмена реагируют на ишемические и гипоксические повреждения, проанализировали показатели активности фермента цикла Кребса

сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и показателя гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в нейронах первичной соматосенсорной коры на 21-е и 42-е сутки эксперимента, дополнительно оценили активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [10, 11].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистической программы «Statistica 10» (StatSoftInc., USA). Для интерпретации данных использовали среднее значение (М) и стандартное отклонение (SD), для сравнения независимых выборок использовали t-критерий Стьюдента, для анализа полученных данных использовали номинальный уровень статистической значимости ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. При изучении гистоструктуры области первичной соматосенсорной коры группы интактных животных выявлены незначительные изменения, характерные для естественных апоптотических процессов.

Оценка гистоструктурных изменений области первичной соматосенсорной коры на 21-е сутки после моделирования ишемического инсульта в группе контроля показала выраженные нарушения структуры значительной части нейронов у самцов и самок: встречались клетки с вакуолизацией цитоплазмы, гипохромные нейроны, единичные клетки-«тени» (рисунок 1 А, Б); в обеих контрольных группах животных к 42-м суткам эксперимента в соматосенсорной коре выявили снижение количества клеток с деструктивными изменениями (рисунок 1, В, Г).

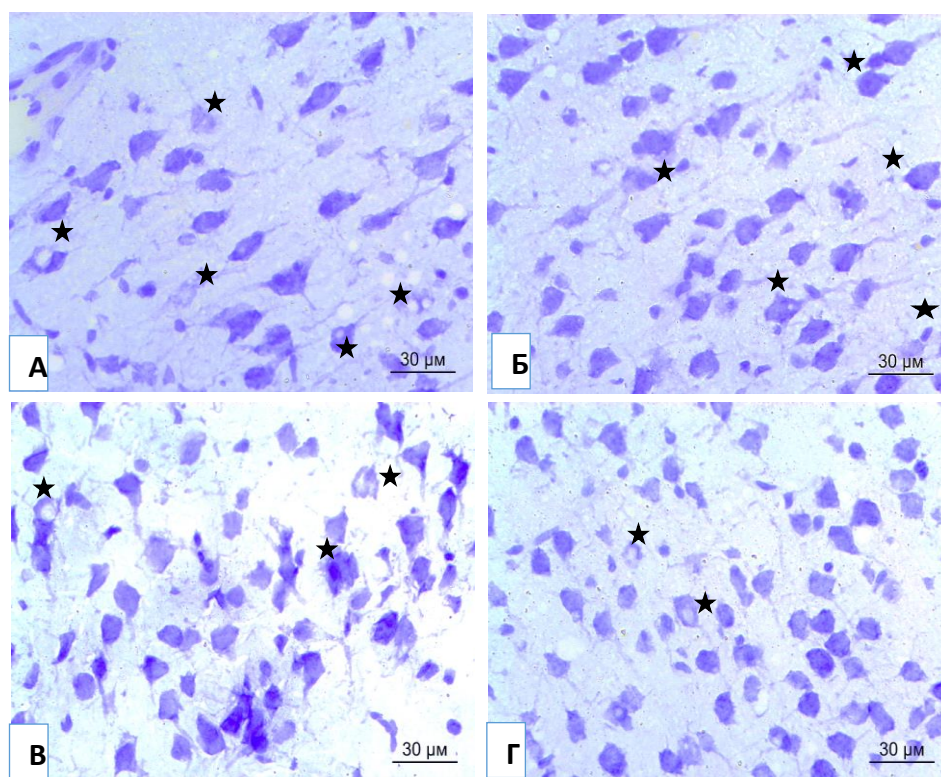


Рис.1. Гистоструктура первичной соматосенсорной коры крыс групп контроля на 21-е (А, Б) и 42-е сутки (В, Г) после моделирования ишемии: А, В – самцы, Б, Г – самки. Звездочками отмечены деструктивно измененные нейроны. Окраска: по Нисслю. Увеличение: 400×

При изучении гистоструктуры соматосенсорной коры крыс самцов на 21-е и 42-е сутки после моделирования ишемии и однократного внутрицентрального введения AAVR15 определили менее выраженные нарушения структуры значительной части нейронов как самцов и самок: встречались единичные клетки с вакуолизацией цитоплазмы и гипохромные нейроны (рисунок 2, А–Г).

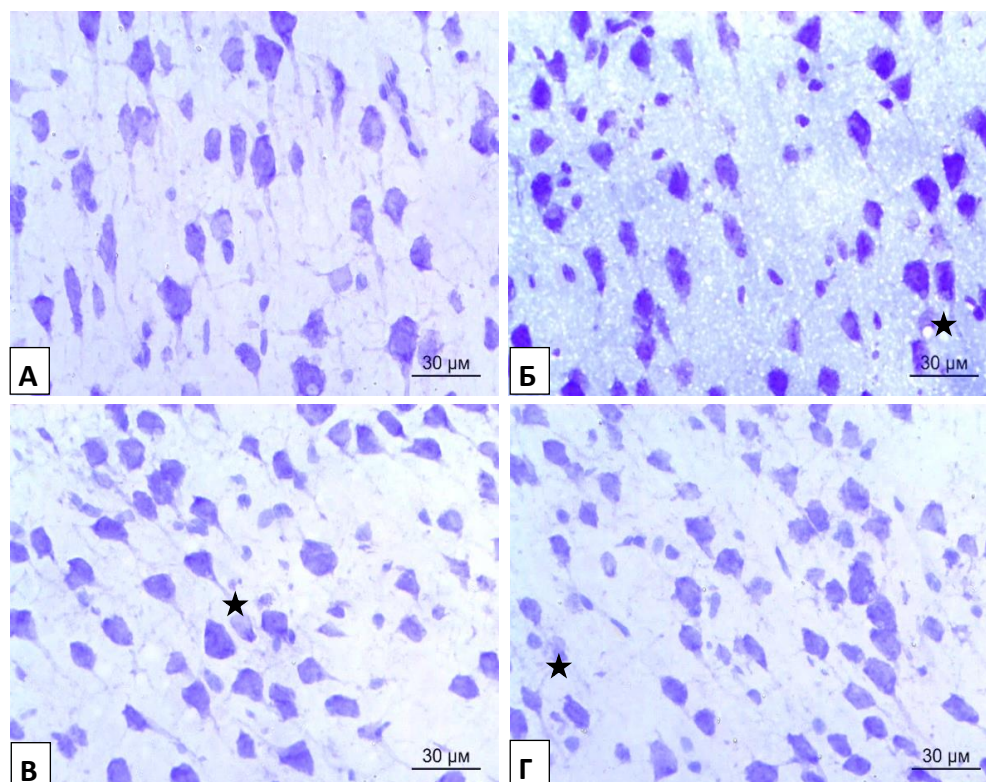


Рис.2. Гистоструктура первичной соматосенсорной коры на 21-е (А, Б) и 42-е сутки (В, Г) животных с экспериментальной ишемией головного мозга после введения AAVJ15: А, В – самцы, Б, Г – самки. Окраска: по Нисслю. Увеличение: 400×

При проведении морфометрического анализа на 21-е сутки эксперимента в контрольной группе крыс самцов по сравнению с интактными животными выявили статистически значимое повышение количества нейронов в области ишемического повреждения мозга с одновременным уменьшением их средних размеров. Зафиксировано также падение активности АХЭ и СДГ, увеличение активности ЛДГ и показателя ИНД, отражающих развитие ишемических и гипоксических повреждений (таблица 1). У крыс самцов после моделирования ишемии и введения векторной конструкции AAVJ15 наблюдали значительное увеличение средних размеров нейронов, активности АХЭ и СДГ, сопровождаемое уменьшением ИНД, по сравнению с аналогичными показателями 2 группы (таблица 1).

Табл. 1. Данные морфометрического исследования первичной соматосенсорной коры крыс самцов и активности ферментов

Показатель	1 группа (интактная)	2 группа (контрольная; без лечения)		3 группа (терапия AAVR15)	
		21-е сутки	42-е сутки	21-е сутки	42-е сутки
Число нейронов, абс. ед.	35,0 ± 7,0	39,5 ± 6,5 [^]	40,0 ± 9,1 [^]	42,5 ± 7,0 [^]	43,0 ± 8,8 [^]
Размер нейронов, мкм ²	124,9 ± 16,4	98,4 ± 7,9 [^]	98,0 ± 12,3 [^]	105,0 ± 12,9 ^{^*}	100,3 ± 10,5 [^]
ИНД	0,05	0,27 [^]	0,29 [^]	0,16 ^{^*}	0,10 ^{^*}
Активность АХЭ, усл. ед.	79,5 ± 14,1	63,7 ± 15,6 [^]	75,3 ± 14,7 [^]	71,0 ± 12,9 ^{^*}	66,9 ± 14,3 ^{^*}
Активность СДГ, усл. ед.	151,6 ± 8,8	113,2 ± 7,8 [^]	118,8 ± 7,8 [^]	116,8 ± 9,0 ^{^*}	123,7 ± 7,7 ^{^*}
Активность ЛДГ, усл. ед.	77,02 ± 7,5	107,2 ± 16,3 [^]	95,1 ± 9,9 [^]	109,2 ± 13,3 [^]	101,8 ± 7,9 ^{^*}

Примечание: [^] – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, * – $p < 0,05$ по отношению к показателям контрольной группы в соответствующий временной точке

На 42-е сутки у крыс самцов контрольной группы определили статистически значимое увеличение плотности расположения нейронов, но средний размер их оставался низким по сравнению с аналогичными показателями группы интактного контроля. Зарегистрированы также пониженные значения АХЭ, СДГ и повышенная активность ЛДГ, что указывает на сохранение ишемических и

гипоксических повреждений участка мозга. Об этом свидетельствует и высокий ИНД (таблица 1). У крыс самцов, получивших генную терапию, выявлена тенденция к увеличению числа нейронов и их размеров, значимо повышалась активность СДГ и ЛДГ, снижался показатель АХЭ и существенно уменьшался ИНД по сравнению с данными 2 группы (таблица 1).

Морфометрического анализ исследуемых структур головного мозга в контрольной группе крыс самок на 21-е сутки эксперимента позволил выявить статистически значимое уменьшение числа и размеров нейронов, снижение активности АХЭ и СДГ, повышение ИНД и активности ЛДГ по сравнению с аналогичными показателями группы интактного контроля (таблица 2). У крыс самок после моделирования ишемии и введения векторной конструкции AAVJ15 наблюдали значительное увеличение плотности нейронов в области повреждения мозга, активности АХЭ и ЛДГ, сопровождаемое уменьшением активности СДГ и ИНД, по сравнению с аналогичными показателями 5 группы (таблица 2).

К 42-м суткам в контрольной группе самок сохранялись вышеописанные изменения исследуемых показателей по сравнению с интактной группой (таблица 2). У крыс самок, получивших генную терапию, выявлено существенное увеличение всех показателей, за исключением числа нейронов по сравнению с данными 5 группы в аналогичной временной точке (таблица 2).

Табл. 2. Данные морфометрического исследования первичной соматосенсорной коры крыс самок и активности ферментов

Показатель	4 группа (интактная)	5 группа (контрольная; без лечения)		6 группа (терапия AAVR15)	
		21-е сутки	42-е сутки	21-е сутки	42-е сутки
Число нейронов, абс.ед.	40,4±5,5 [#]	33,8±6,7 [^] #	44,9±8,7 [^] #	41,9±5,1 [*]	40,0±9,6 [*]
Размер нейронов, мкм ²	115,2±16,0 [#]	101,8±13,5 [^]	92,2±8,6 [^] #	98,7±7,6 [^] #	103,9±18,2 ^{^*}
ИНД	0,06	0,47 [^] #	0,31 [^]	0,15 ^{^*}	0,14 ^{^*#}
Активность АХЭ, усл. ед.	78,7±14,5	66,1±14,0 [^]	68,4±16,9 [^] #	69,9±12,3 ^{^*}	74,0±15,4 ^{^*#}
Активность СДГ, усл. ед.	148,7±11,1 [#]	119,8±6,5 [^] #	115,7±9,3 [^] #	102,7±16,4 ^{^*#}	123,2±7,5 ^{^*}
Активность ЛДГ, усл. ед.	77,5±7,8	102,2±12,2 [^] #	93,0±7,6 [^] #	105,1±11,8 ^{^*#}	101,7±6,9 ^{^*}

Примечание: [^] – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, ^{*} – $p < 0,05$ по отношению к показателям контрольной группы, [#] – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы самцов

Сравнительный анализ морфометрических показателей позволил выявить различия у интактных самок крыс по сравнению с самцами: зафиксировали статистически значимое повышенное количество нейронов, уменьшенный размер нейронов со сниженной активностью СДГ без изменений других исследуемых показателей; в контрольной группе самок по сравнению с контрольной группой самцов регистрировали повышение ИНД, активности СДГ, снижение количества нейронов и активности ЛДГ на 21-е сутки эксперимента, в то время как на 42-е сутки повышалось число нейронов, уменьшался их размер снижались активность АХЭ, ЛДГ и СДГ (таблица 1, таблица 2). После однократной внутрицентральной инъекции AAVR15 на 21-е сутки эксперимента также выявили гендерные различия морфометрических показателей ишемизированной области соматосенсорной коры головного мозга: у самок был меньше размер нейронов, более низкая активность СДГ и ЛДГ; на 42-е сутки наблюдений после проведения аналогичного сопоставления определили, что у самок был более высокий ИНД и повышенная активность АХЭ без существенных отличий в других исследованных показателях (таблица 1, таблица 2).

Таким образом, полученные данные показали гендерные различия как в гистоструктурных изменениях, протекающих при моделировании ишемического инсульта, так и при репаративных процессах после введения тестируемой субстанции в область повреждения первичной соматосенсорной коры головного мозга. После однократной внутрицентральной инъекции нейротрофического фактора мозга, связанного с аденоассоциированным вирусным вектором, у крыс выявили тенденцию к улучшению показателей, отражающих процессы нейрорегенерации головного мозга в позднем постинсультном периоде, что является предпосылкой для формирования комплексного подхода в лечении и реабилитации данной патологии.

Литература:

- [1] Максимова М.Ю., Айранетова А.С. Гендерные особенности течения и прогноза ишемического инсульта / Consilium Medicum. 2019. Vol. 21, № 9. P. 9–15.
- [2] Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence // Pain. 1993. Vol. 52. № 3. P. 259–285.
- [3] Terence J.C., Katz J., Vaccarino A.L. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence // Pain. 1993. Vol. 52. № 3. P. 259–285.
- [4] Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Дубина А.И. и др. Роль АТФ-зависимых калиевых каналов в процессе гипоксического и ишемического preconditionирования у крыс с фокальной ишемией мозга // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2007. Т. 4, № 6. С. 68–77.
- [5] Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L. et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarctions // Stroke. 1986. Vol. 17. P. 738–743.
- [6] Lu Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy – a review // Stem Cells Dev. 2004. Vol. 13. P. 33–145.
- [7] Aarse J., Herlitze S., Manahan-Vaughan D. The requirement of BDNF for hippocampal synaptic plasticity is experience-dependent. // Hippocampus. 2016. Vol. 26. P. 739–751.
- [8] European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Europ. Treaty Series. Strasbourg. 1986. № 123. P. 48.
- [9] Paxinos Y., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates // San Diego : Academic Press. 1998. P. 256 p.
- [10] Лойда З., Госсрай Р., Шиблер Т. // Гистохимия ферментов / М.: Мир, 1982. 272 с.
- [11] Karnovsky M.A., Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases // J. Histochem. Cytochem. 1964. Vol. 12, № 3. P. 219–229.

ZH. A. HLADKOVA, T.E. KUZNETSOVA, E. V. FEDOROVA, S. G. PASHKEVICH, G. P. MIRONOVA,
S. V. MANKOVSKAYA

**MORPHOMETRIC CHANGES IN THE RAT PRIMARY SOMATOSENSORY CORTEX WITH
CEREBRAL ISCHEMIA AFTER INTRODUCTION OF A VECTOR CONSTRUCT CONTAINING
A SECTION OF THE BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE**

*State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus",
Minsk, Republic of Belarus*

Summary

The high degree of disability and mortality actualizes the search for new methods for the prevention and treatment of strokes. It seems promising to study medical substances aimed at restoring neurons in the early post-stroke period. The article discusses morpho-histochemical changes in the modeling of ischemic stroke, including geographical differences in the recovery of damaged parts of the rat brain, after a single intracranial injection of brain-derived neurotrophic factor associated with an adeno-associated viral vector.

Key words: rat brain, ischemic stroke, intracranial administration, biological therapy.

УДК 57.041: 57.017

И. П. ЖАВОРОНОК¹, С. В. МАНЬКОВСКАЯ¹, Н. И. СЧАСТНАЯ¹, О. А. АНТИПОВА¹,
Т. А. ФИЛИПОВИЧ¹, Е. В. ФЁДОРОВА¹, Н. А. РОГОВОЙ², С. А. АЛЕКСЕЕВ²

КРИТИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫСЫ: ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Предложена модификация способа индукции ишемии задней конечности крысы путем иссечения участка бедренной артерии длиной не менее 20 мм. Модификация хирургической модели критической ишемии у крыс приводила к развитию артериальной недостаточности задней конечности, которая сопровождалась выраженной гипералгезией, снижением значений площади и интенсивности отпечатка травмированной лапы и сокращением числа функционирующих кровеносных капилляров.

Ключевые слова: критическая ишемия задней конечности, порог ноцицептивной реакции, параметры походки, гистологический анализ.

Введение. Развитие критической ишемии нижних конечностей (КИНК) у пациентов характеризуется многоуровневым сосудистым поражением с преимущественным вовлечением периферического русла [1]. В лечении заболевания приоритетными на данный момент являются хирургические методы, что подтверждается большим количеством клинических и эпидемиологических исследований с высоким уровнем доказательности. Однако, у части пациентов возможности хирургических и эндоваскулярных методов коррекции магистрального кровотока ограничены из-за невозможности адекватной реконструкции дистального сосудистого русла [2]. Это обуславливает актуальность поиска путей паллиативной реваскуляризации.

Для оценки безопасности и эффективности разрабатываемых терапевтических средств используются различные экспериментальные модели ишемии конечности у крысы. Так, зарубежными авторами предложен способ моделирования рассматриваемой патологии путем перевязки бифуркации бедренной артерии. Кровоток прекращался по поверхностной и глубокой артерии бедра [3]. Описана также хирургическая модель ангиопатии, основанная на лигировании подвздошной артерии и нанесении 2–3 кожных ран на стопе животного [4]. В обоих случаях из-за особенностей ветвления артерий нижних конечностей у грызунов, последние достаточно быстро восстанавливались [4]. Более агрессивной является модель, суть которой заключается в иссечении бедренной, подколенной и начальных отделов передней и задней большеберцовых артерий. Отходящие от артерий коллатерали первого порядка также пересекали и лигировали [5]. Э.Э. Файзиев и соавт. разработали резекционную модель, включающую удаление бедренной, подколенной, передней и задней большеберцовой артерий, бедренной вены и пересечение седалищного нерва [6]. Данные экспериментальные модели позволили воспроизвести хроническую ишемию конечности, но характеризовались высоким риском послеоперационных осложнений и требовали хорошей хирургической подготовки.

В проведенных исследованиях нами была предложена модификация способа моделирования критической ишемии задней конечности, описанного М.А. Юдиным и соавт. [7]. Согласно данной модели, разрез кожи у лабораторных животных выполняют в проекции бедренной артерии, затем осуществляют её лигирование двумя лигатурами на расстоянии 0,5 см друг от друга с последующим иссечением участка сосуда между лигатурами.

Целью данного исследования явилась верификация экспериментальной модели критической недостаточности артериального кровоснабжения задней конечности у крыс и её патофизиологическая характеристика.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на белых половозрелых крысах-самках Wistar (n=19) массой 250–280 г, содержащихся в условиях

конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларуси в режиме 12/12-часового цикла ночь/день при температуре $22,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ и влажности 60–65 %. Все животные имели свободный доступ к корму и питьевой воде. Дизайн исследования одобрен Комитетом по биоэтике института (протокол № 5 от 17.05.2023 г.). До начала эксперимента животные находились в виварии под карантинным наблюдением в течение двух недель. Для эксперимента отобраны активные крысы с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающие корм. Животных разделили на две группы: контрольную группу – интактные (здоровые) животные ($n=6$) и опытную группу – животные с моделью экспериментальной критической ишемией задних конечностей ($n=13$).

Моделирование КИНК проводили под общим наркозом (тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно). Крыс фиксировали на спине, после подготовки операционного поля (сбривание шерсти и обработка 70 % раствором спирта) выполняли разрез кожи по внутренней поверхности правого бедра ниже паховой связки. Сначала выделяли элементы сосудисто-нервного пучка бедра, затем бедренную артерию отделяли от вены и нерва, мобилизовали (пересекали отходящие от нее ветви первого порядка). У места начала артерии (ниже уровня паховой связки) накладывали первую лигатуру с использованием полимерного не рассасывающегося шовного материала, другую лигатуру – на расстоянии не менее 20-и мм от предыдущей у подколенной бифуркации артерии. Участок бедренной артерии между двумя лигатурами иссекали. Рану на бедре ушивали шовным материалом «Сургикрол» 3/0 («Футберг», Беларусь), швы обрабатывали 1 % раствором бриллиантового зеленого. Для предупреждения инфицирования раны крысам сразу после операции подкожно вводили антибиотик цефтриаксон в дозе 200 мг/кг. Животные находились в индивидуальных боксах под постоянным визуальным контролем до полного пробуждения от наркоза.

Динамическое наблюдение за развитием симптомов КИНК осуществляли путем регистрации значений порога ноцицептивной реакции, параметров походки, проводили гистологические исследования мышц бедра и голени. Порог ноцицептивной реакции (ПНР) на механический стимул определяли до операции по моделированию критической ишемии конечности, а также на 14-е, 28-е и 60-е сутки после нее с помощью альгезиметра в тесте «Рэндалла-Селитто» (Panlab, Испания) [8]. Измерения ПНР проводили трехкратно с интервалом 5–7 мин.

Анализ параметров походки проводили в вышеуказанные сроки с использованием аппаратно-программного комплекса CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Голландия), представляющего собой коридор со стеклянным полом (дорожкой), подсвечиваемым одновременно зелеными светодиодами и красным светом. На расстоянии 56-и см ниже стеклянной дорожки располагали высокоскоростную камеру с широкоугольным объективом (Gevicam GP-3360, GEViCAM Inc., США), что позволяет автоматически регистрировать отпечатки лап, когда животное пересекает участок дорожки с откалиброванной длиной. Запись пробежек осуществляли в темном вентилируемом помещении при низком уровне шума. Каждое животное тестировали до получения трех адекватных пробежек (вариация <75 %, время пробежки <5 с). Оценивали площадь отпечатка (см^2) и интенсивность отпечатка в абсолютных единицах (аб.ед.) [9, 10].

Для изучения структуры мышц бедра и голени проводили стандартное гистологическое исследование. Забор образцов мышечной ткани бедра и голени задних конечностей крыс осуществляли на 14-е, 28-е сутки эксперимента. Материал фиксировали в 10 %-ом нейтральном забуференном формалине в течение не менее 24 ч. Далее проводили гистологическую проводку в вакуумном тканевом процессоре KD-TS6B (Китай) и заливку в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм, полученные при помощи ротационного микротомы CUT5062 (SLEE medical, Германия), наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием. После депарафинизации в ксилоле и обезвоживания в растворах этилового спирта возрастающей концентрации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Полученные микропрепараты просматривали с помощью светового микроскопа Optec BK 5000, оснащенного цифровой камерой (Optec, Китай). Дополнительно в программе Image J (США) регистрировали соотношение количества кровеносных сосудов к количеству мышечных волокон в 10-и полях зрения при увеличении $\times 400$ [11].

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы Statistica 10. Результаты исследования представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm Sd$). Нормальность распределения выборок проверяли с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Оценку статистической значимости количественных признаков определяли с помощью t-критерия Стьюдента

и критериев Вилкоксона для зависимых и Манна-Уитни для независимых выборок в парных сравнениях. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Общее состояние и поведение животных на протяжении всего периода наблюдения носили нормальный характер. Шерстный покров был яркий, блестящий, гладкий, очагов облысения не наблюдалось. Кожа бледно-розовая, эластичная, подвижная, без повреждений. Видимые слизистые оболочки (глаз, носовой, ротовой полостей) бледно-розовые, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений. Патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. В первые двое суток после моделирования КИНК животные старались не наступать на прооперированную конечность (далее ипсилатеральная), в последующие сутки развивалась перемежающаяся хромота, но в целом состояние крыс было удовлетворительное: они реагировали на раздражители; охотно поедали корм и потребляли воду. Динамика массы тела у животных была положительной (рисунок 1).

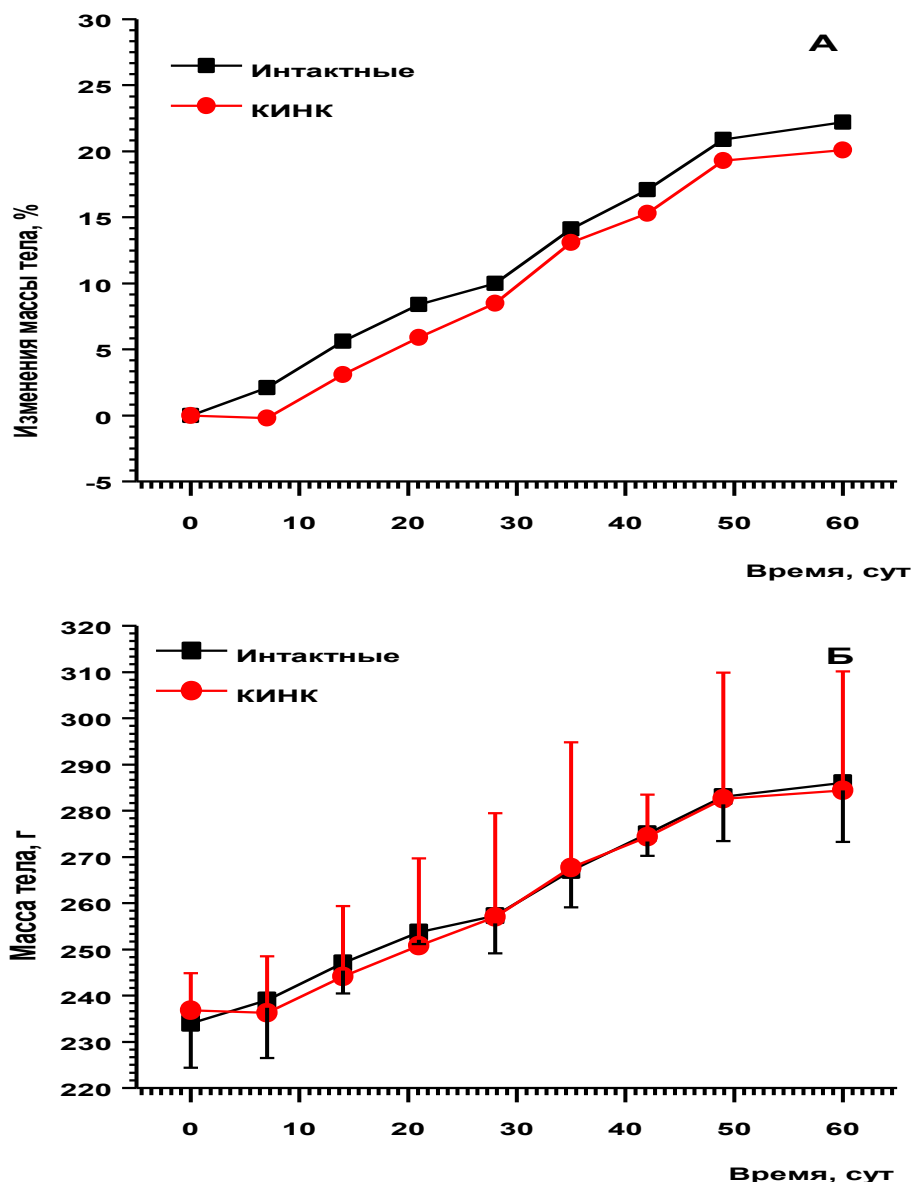


Рис. 1. Динамика изменения массы тела экспериментальных животных: А – в процентах, Б – в граммах

Экспериментальная модель КИНК сопровождалась развитием механической гипералгезии на 14-е и усугублялась на 28-е сутки эксперимента, что выражалось в снижении значений ПНР ипсилатеральной конечности на 18,9 % (с $139,8 \pm 5,0$ г до $113,3 \pm 3,5$ г, $p < 0,005$) и на 36,9 % (с $139,8 \pm 5,0$ г до $88,2 \pm 6,0$ г, $p < 0,005$) соответственно (рисунок 2). При этом, значения ПНР у животных с индуцированной ишемией на 14-е сутки были ниже соответствующих показателей у интактных животных на 13,9 %, а на 28-е сутки – на 32,4 % (рисунок 2). Значения ПНР левой

здоровой (контралатеральной) задней конечности у животных группы с КИНК, как и данный показатель для правой конечности интактных животных, не изменялись в данных временных точках ($p>0,05$) (рисунок 2).

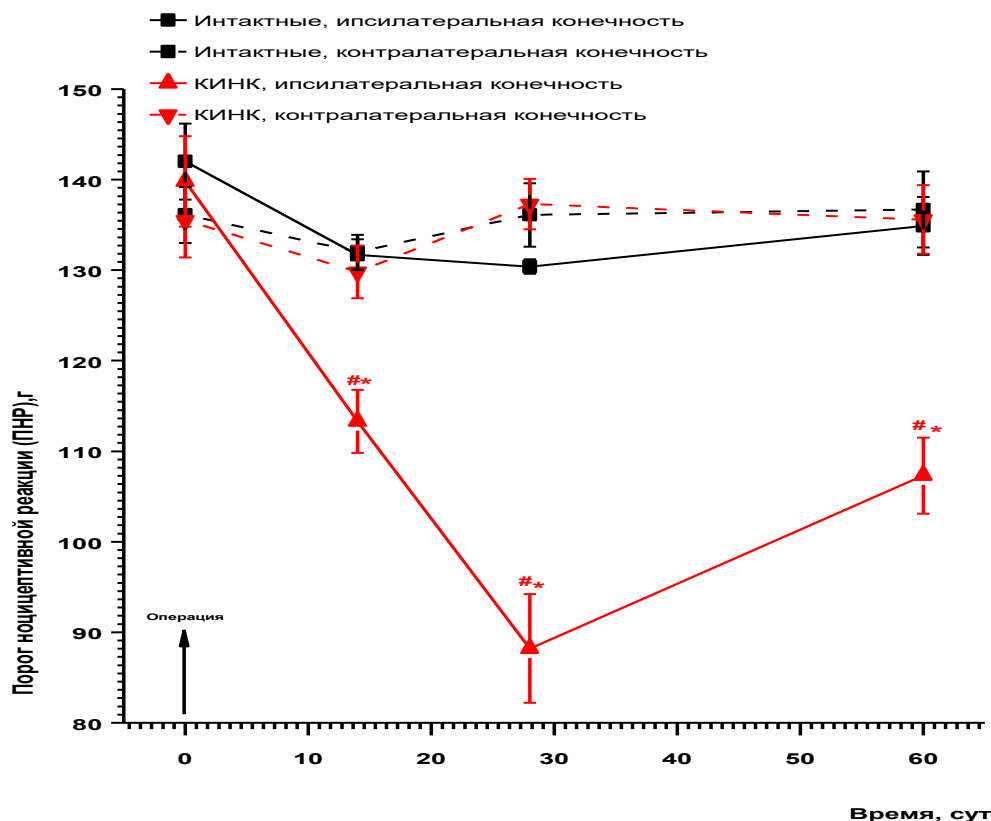


Рис. 2. Изменение порога ноцицептивной реакции крыс с экспериментальной ишемией задних конечностей; * – $p\leq 0,05$ по сравнению со значением ПНР интактных животных, # – $p\leq 0,05$ по сравнению с фоновыми значениями ПНР до операции

При оценке паттернов походки (*площади и интенсивности отпечатка* прооперированной конечности) у экспериментальных животных в те же сроки исследования были установлены изменения, соответствующие модуляциям ноцицептивных реакций. При этом достоверное снижение указанных параметров на 30–35 % было зафиксировано на 14-е сутки и сохранялось на протяжении всего периода мониторинга (таблица 1).

Табл. 1. Изменения параметров походки у экспериментальных животных

Группа животных	Продолжительность эксперимента, сутки			
	0 (день операции)	14	28	60
<i>Площадь отпечатка правой лапы, (M±Sd), см²</i>				
Интактная	1,26±0,47	1,27±0,31	1,19±0,51	1,16±0,12
КИНК	1,02±0,41	0,70±0,24*	0,79±0,29*	0,74±0,25*
<i>Интенсивность отпечатка правой лапы, (M±Sd), аб.ед.</i>				
Интактная	72,26±4,68	77,98±2,03	94,65±1,42	83,69±13,35
КИНК	80,26±9,27	62,49±13,31*	63,13±14,33*	64,92±17,43*

Примечание: * – $p\leq 0,05$ по отношению к фоновым значениям

Гистоструктура скелетных мышц бедра и голени интактных крыс представлена полигональными профилями мышечных волокон относительно единообразных диаметров с собственными ядрами на периферии под сарколеммой, минимальными прослойками соединительнотканых оболочек – эндо- и перимизия. На продольных срезах в скелетной мышечной ткани в саркоплазме визуализировали поперечную исчерченность (рисунок 3, А, Б). Хорошо определялись мелкие и крупные кровеносные сосуды, просветы которых были широкими, эндотелиальные клетки – без патологических изменений.

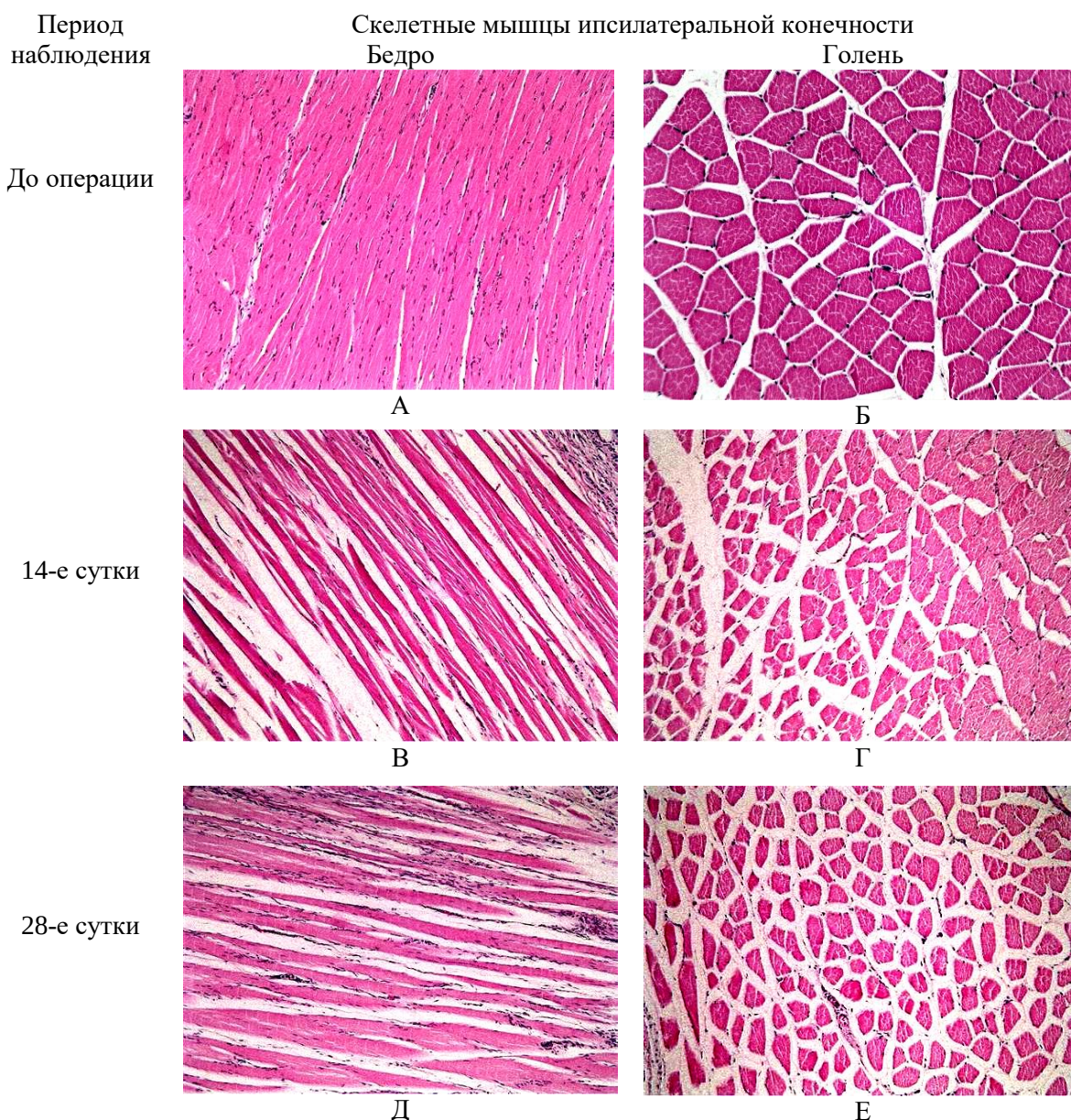


Рис. 3. Морфологическая характеристика скелетных мышц бедра и голени крыс экспериментальных групп (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$). А, Б – гистологическая картина без особенностей; В, Г – мышечные волокна с признаками ишемии; Д, Е – мышечные волокна с признаками ишемии и атрофии, пролиферация сосудов и клеток эндо- и перимизия, очаги регенерирующих миобластов

На препаратах тканей бедра на 14-е сутки после моделирования КИНК отмечали признаки ишемии мышечных волокон с просветлением цитоплазмы и потерей поперечной исчерченности, миолиза, кариолизиса наряду с выраженным межмышечным отеком (рисунок 3, В). В артериолах наблюдали гипертрофию клеток эндотелия и отдельных ядер гладкомышечного слоя с умеренно выраженным периваскулярным фиброзом и круглоклеточным инфильтратом с примесью нейтрофилов. При микроскопическом изучении гистологических препаратов мышц голени на 14-е сутки после моделирования КИНК наблюдали умеренно выраженные дистрофические изменения мышечных волокон в виде нарушения поперечной исчерченности, миолиза и очаговой фрагментации. Отмечали фокусы с неравномерной атрофией миоцитов в сочетании с гомогенизацией и умеренным межмышечным отеком (рисунок 3, Г). В толще мышечных волокон выявлен незначительный воспалительный инфильтрат. В артериолах наблюдали адгезию эритроцитов, выпячивание ядер эндотелиоцитов в просвет, пролиферацию клеток гладкомышечного слоя. В периваскулярном пространстве визуализировался слабовыраженный фиброз со скудной воспалительной инфильтрацией, представленной лимфоцитами и нейтрофилами.

В тканях бедра на 28-е сутки после моделирования КИНК на фоне нарастания ишемии и атрофии мышечных волокон со скудной воспалительной инфильтрацией выявлены участки регенерирующих миобластов с умеренно выраженным межмышечным фиброзом (рисунок 3, Д). Визуализировали липоматоз и периваскулярный фиброз, скопление эритроцитарных масс в сосудах микроциркуляторного русла, новообразованные сосуды. В отдельных артериолах ядра эндотелия выбухали частоколом в просвет сосуда. При микроскопическом изучении гистологических препаратов скелетных мышц голени на 28-е сутки после моделирования КИНК прогрессировали атрофические и ишемические изменения мышечных клеток в сочетании с интерстициальным отеком (рисунок 3, Е). Определяли пролиферацию сосудов микроциркуляторного русла среди мышечных волокон, гипертрофию эндотелиальных клеток и выпячивание их в просвет сосудов, очаговый отек субэндотелиального пространства артериол. В периваскулярном пространстве отмечена слабовыраженная круглоклеточная воспалительная реакция с примесью сегментоядерных нейтрофилов и периваскулярный фиброз в сочетании с умеренным липоматозом поверхностной фасции. При морфометрическом исследовании гистологических препаратов оценивали динамику количества сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, в поле зрения на поперечных срезах скелетных мышц нижних конечностей в экспериментальных группах (таблица 2).

Табл. 2. Динамика количества сосудов скелетных мышц нижних конечностей крыс в экспериментальных группах на 14-е и 28-е сутки, (M±Sd)

№ п/п	Группа животных		14-е сутки	28-е сутки
1	Интakтная	бедро	2,95±1,01	2,95±1,01
		голень	2,50±0,91	2,50±0,91
2	КИНК	бедро	2,41±1,05*	2,87±1,32^
		голень	2,03±0,94*	2,38±1,09^

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе интактных животных; ^ – $p \leq 0,05$ по отношению к 14-м суткам в группе животных с КИНК

Установлено, что на 14-е сутки эксперимента в группе животных с КИНК выявлено статистически значимое снижение количества сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, в бедре и в голени по отношению к интактным животным. Так, количество сосудов в бедре у оперированных крыс на 14-е сутки составило $2,41 \pm 1,05$ ($p=0,00$), в голени – $2,03 \pm 0,94$ ($p=0,00$). На 28-е сутки зафиксирована тенденция к восстановлению исследуемого показателя до значений у интактных крыс, что указывает на начало процесса восстановления кровотока в ишемизированной мышце за счёт особенности кровоснабжения конечностей у грызунов.

Заключение. Предложенная модификация хирургической модели критической ишемии, основанная на иссечении участка бедренной артерии длиной не менее 20 мм, у крыс приводит к развитию артериальной недостаточности задней конечности. Описанная экспериментальная модель характеризуется снижением кровотока в мышечной ткани задней конечности экспериментальных животных, которое при морфологическом анализе образцов тканей подтверждается достоверным сокращением числа функционирующих кровеносных капилляров. Установлены выраженные изменения ноцицептивной чувствительности и паттернов походки у животных с индуцированной ангиопатией. Развитие экспериментальной ишемии сопровождается выраженной гипералгезией и опосредованной ею перемежающейся хромотой, о чем свидетельствует достоверное снижение значений порога ноцицептивной реакции, а также площади и интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности у животных с патологией.

Литература:

- [1] Uccioli L., Meloni M., Izzo V. et al. Critical limb ischemia: current challenges and future prospects // Vascular Health and Risk Management. 2018. Vol. 14. P. 63–74.
- [2] Biscetti F., Nardella E., Rando M.M. et al. Outcomes of lower extremity endovascular revascularization: potential predictors and prevention Strategies // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 2002.
- [3] Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal // Thromb Haemost. 2010. Vol. 103, №4. P 696–709.
- [4] Waterman R. S., Betancourt A. M. Treating chronic pain with mesenchymal stem cells: A therapeutic approach worthy of continued investigation. // J. Stem. Cell Res. Ther. 2011. Vol.2. P. 2–9. doi:10.4172/2157-7633.S2-001.
- [5] Орлова А. Ю., Суковатых Б. С., Артюшкова Е. Б., Гордов М. Ю. Патент № 2556606 Российская Федерация. Способ лечения хронической ишемии конечности в эксперименте №2014113802/14. Курский государственный университет, заявл. 04.08.2014.

- [6] Фейзи́ев Э. Э., Белоус А. С., Суковатых Б. С., Трубникова Е. В. Патент № 2734158 Российская Федерация. Способ моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных – крыс № 2020111315. Курский государственный университет, заявл. 18.03.2020.
- [7] Юдин М. А., Плакса И. Л., Мжаванадзе Н. Д. и др. Оценка системного распределения и ангиогенного эффекта pl-VEGF165 в модели ишемии конечностей // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015. Т. 19, № 4–2. С. 33–42.
- [8] Deuis J. R., Dvorakova L. S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2017. Vol.10. P. 1–17.
- [9] Gait analysis sistem for rodents CatWalk XT [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.noldus.com/catwalk-xt>. – Дата доступа: 05.04.2024.
- [10] Solutions for rodent gait analysis [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://info.noldus.com/hubfs/resources/noldus-white-paper-catwalk-getting-perfect-runs.pdf>– Дата доступа: 05.04.2024.
- [11] Деев Р.В., Мжаванадзе Н.Д., Мавликеев М.О. и др. Патогистологические изменения скелетных мышц при хронической артериальной недостаточности нижних конечностей // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2015, Т. 10, № 2, С. 18–21.

I. P. ZHAVORONOK¹, S. V. MANKOVSKAYA¹, N. I. SHCHASNAYA¹, O. A. ANTIPOVA¹,
T. A. FILIPOVICH¹, E. V. FIODOROVA¹, N. A. ROGOVOY², S. A. ALEKSEEV²

CRITICAL ISCHEMIA OF THE RAT HIND LIMB: PATHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE MODEL

¹ State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus

² Educational Institution “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

A modification of the method for simulating ischemia of the rat hind limb by excision of a section of the femoral artery with a length of at least 20 mm was proposed. Modification of the surgical model of critical ischemia in rats led to the development of arterial insufficiency of the hind limb, which was accompanied by severe hyperalgesia, a decrease in the area and intensity of the injured paw print, and a reduction in the number of functioning blood capillaries.

Keywords: critical ischemia of the hind limb, nociceptive threshold, gait parameters, histological analysis.

А. А. БАСАЛАЙ

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЖИРОВОГО РАЦИОНА ПИТАНИЯ САМОК КРЫС ВИСТАР НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИХ ПОТОМСТВА МУЖСКОГО ПОЛА

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Проведено исследование влияния высокожировой диеты (ВЖД) самок крыс на поведенческие характеристики и уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF) у потомства мужского пола в сопоставлении с последствиями фетального вальпроатного синдрома (ФВС), который является общепринятой моделью дисфункции нервной системы. Показано, что потребление ВЖД самками крыс приводит к появлению признаков повышенной тревожности и сниженной двигательной активности у потомства мужского пола. Потомство с ФВС характеризуется выраженным тревожным поведением, снижением исследовательской и двигательной активности. Сочетанное воздействие ВЖД и ФВС вызывает суммирование ряда негативных последствий. Определение BDNF в сыворотке крови потомства в экспериментальных группах позволило выявить статистически значимое снижение уровня данного белка, наиболее выраженное в группе сочетанного воздействия.

Ключевые слова: высокожировая диета, фетальный вальпроатный синдром, фетальное программирование, поведенческие реакции, нейротрофический фактор мозга.

Введение. Фетальное программирование представляет собой процесс воздействия факторов внешней и внутренней среды на внутриутробное развитие плода путем модификации синтеза фетальных и плацентарных гормонов. Данный процесс может быть, как адаптивным, так и дезадаптивным, приводя к метаболическим нарушениям и вызывая предрасположенность к различным заболеваниям в течение дальнейшего постнатального развития. Известно, что адаптация взрослого организма к условиям среды является обратимой, тогда как адаптация плода может приводить к необратимым изменениям в геноме и отражаться на функциональном состоянии развивающегося организма [1].

В настоящее время пищевой статус матери (масса тела и рацион питания) рассматривается как один из эпигенетических факторов фетального воздействия на развитие ребенка, который действует наряду с генетической программой. Состояние эндокринной и иммунной систем матери, стрессы и вредные привычки во время беременности вносят вклад в последующее развитие заболеваний у плода [2]. Показано, что развитие плода, происходящее в условиях недостаточного питания или избыточного снабжения эмбриона питательными веществами, в дальнейшем повышает риски формирования индивидуальной склонности к ожирению, метаболическому синдрому, сахарному диабету 2 типа, и сердечно-сосудистым заболеваниям [2, 3]. Показано, что помимо метаболических и эндокринных эффектов, рацион матери во время беременности оказывает влияние на формирование и функционирование нервной системы плода, что в последующем может привести к развитию поведенческих нарушений и расстройств психики у ребенка [4, 5]. Механизмы развития подобных отклонений на сегодняшний день остаются невыясненными и требуют дальнейших исследований.

Изучение влияния рациона самок крыс на поведенческие характеристики потомства целесообразно проводить в сравнительном аспекте, используя для сопоставления известные модели дисфункции нервной системы. Одной из таких хорошо изученных моделей является ФВС. Данный экспериментальный синдром у крыс приводит к развитию целого ряда поведенческих отклонений, схожих с симптомами расстройств аутистического спектра (РАС) у людей [6]. Также представляет интерес изучить влияние рациона самок крыс на состояние их потомства, используя диету, имитирующую по своему составу нездоровый стиль питания, который включает обилие натуральных или модифицированных жиров, быстрых углеводов, характерный для современного человека.

Цель исследования: оценить поведенческие характеристики и уровень нейротрофического фактора мозга у потомства мужского пола, рожденного от самок крыс, получавших высокожировую

диету; сопоставить влияние высокожировой диеты с характеристиками фетального вальпроатного синдрома.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на крысах Вистар (самки, $n=100$; потомство мужского пола, $n=240$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты. Все эксперименты проведены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными и одобрены Комитетом по биоэтике Института физиологии [7].

Крысы-самки ($n=100$) были введены в эксперимент в 8-ми недельном возрасте с исходной массой тела 60–80 г. На протяжении следующих 8-ми недель 50 самок находились на стандартном питании вивария, остальные 50 особей получали ВЖД. Далее половозрелых самок крыс (возраст 16 недель) для получения потомства спаривали с самцами, содержавшимися на стандартной диете вивария. День обнаружения спермы в вагинальных мазках считался первым днем беременности крысы.

Для изучения фетального программирования самки были разделены на следующие группы:

- 1) Контроль – стандартный рацион вивария ($n=25$);
- 2) «Жиры» – ВЖД ($n=25$);
- 3) «ФВС» – стандартный рацион вивария и введение вальпроевой кислоты в период беременности ($n=25$);
- 4) «Жиры+ФВС» – ВЖД и введение вальпроевой кислоты в период беременности ($n=25$).

На следующем этапе эксперимента новорожденных крысят-самцов отлучали от самок на 30-й день жизни и подразделяли на группы в соответствии с исходными группами самок: «Потомство. Контроль» ($n=60$); «Потомство. ФВС» ($n=31$); «Потомство. Жиры» ($n=88$); «Потомство. Жиры+ФВС» ($n=61$). Все крысята из групп «Потомство» получали стандартный рацион вивария. Далее проводилось изучение особенностей поведения потомства мужского пола и определение BDNF в сыворотке крови.

Экспериментальное моделирование ВЖД: самкам крыс с 8-ми недельного возраста и в течение 16-ти недель (8 недель до беременности, во время беременности и в период лактации) дополнительно к стандартному рациону питания вивария добавляли модифицированные жиры растительного происхождения (в виде маргарина с массовой долей жира 82 %) из расчета 20 % от суточной калорийности корма.

ФВС у потомства крыс моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения самкам на 13-й день беременности раствора натриевой соли вальпроевой кислоты в дозе 600 мг/кг [8].

Ориентировочно-двигательную активность потомства крыс в возрасте 57–62 дня изучали в тесте «Открытое поле», для интерпретации полученных показателей использовали методические рекомендации [9–11]. Для изучения исследовательской и двигательной активности, уровня тревожности у потомства крыс в возрасте 63–69 дней использовали тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» («ПКЛ») [9]. Регистрацию поведения каждого животного проводили в течении 5-ти минут с помощью видеокамеры Logitech Webcam 905 (Logitech, Китай). Обработку полученных данных осуществляли в специализированной программе ANY-Maze (Stoelting Inc., США).

Содержание BDNF в сыворотке крови потомства определяли методом неконкурентного иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа (Fine Test, Китай).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистической программы «Statistica 10» (StatSoft Inc., USA). Характер распределения исследуемых показателей проверяли по критерию Шапиро-Уилка. При условии нормальности распределения использовали параметрические методы статистики: данные были представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$), статистически значимые различия между группами были оценены на основании t -критерия Стьюдента. При ненормальном распределении значений применяли непараметрические методы статистики: результаты были представлены в виде медианы и процентилей (Me [25;75]), статистически значимые различия рассчитывали по U -критерию Манна-Уитни. Статистически значимые различия выявляли при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По результатам теста «Открытое поле» у крысят-самцов группы «Потомство. Жиры» было выявлено увеличение времени выхода из центральной зоны на 38,5 % ($p < 0,05$) и снижение актов груминга на 66,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. Полученные данные свидетельствуют о нарушении адаптационных реакций и повышенном уровне тревожности у животных при помещении их в незнакомые условия: установка большой площади с интенсивным освещением (таблица 1).

Табл. 1. Результаты теста «Открытое поле» у потомства мужского пола

Показатель	Группы			
	«Потомство. Контроль»	«Потомство. Жиры»	«Потомство. ФВС»	«Потомство. Жиры+ФВС»
Латентный период выхода из центральной зоны, с	6,50 (4,00;11,50)	9,00 (6,50;13,00) *	7,00 (5,00;16,00)	10,00 (6,00;13,00) *
Число центральных секторов	6,50 (3,00;14,00)	6,00 (2,00;11,00)	4,00 (1,00;7,00) *#	4,00 (1,00;9,00) *
Число периферических секторов	38,50 (28,00;48,00)	36,00 (28,00;43,00)	30,00 (22,00;44,00)	35,00 (25,00;42,00)
Общее число секторов	46,50 (33,00;57,50)	40,00 (32,00;53,00)	36,00 (23,00;50,00) *	39,00 (29,00;52,00) *
Эпизоды груминга	3,00 (2,00;5,00)	1,00 (1,00;2,00) *°	4,00 (1,00;8,00)	2,00 (0,00;3,00) *°

Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от «Потомство. Контроль», # – от «Потомство. Жиры», ° – от «Потомство. ФВС»

У крыс-самцов «Потомство. ФВС» в поведенческом тесте «Открытое поле» при обработке полученных данных выявили снижение пересечений всех секторов арены на 22,6 % ($p < 0,05$), а также избегание центральной зоны на 38,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении исследовательской активности и высоком уровне тревожности у экспериментальных животных (таблица 1). Полученные данные соответствуют характеристикам модели ФВС [12, 13].

У крыс-самцов из группы сочетанного воздействия «Потомство. Жиры+ФВС» при прохождении теста «Открытое поле» было обнаружено снижение как исследовательской, так и горизонтальной двигательной активности, на это указывало статистически значимое уменьшение количества пересеченных центральных секторов на 38,5 % ($p < 0,05$) и общего количества пересеченных секторов на 16,1 % ($p < 0,05$), увеличение длительности латентного периода выхода из центральной зоны арены на 53,8 % ($p < 0,05$) и уменьшение числа актов груминга на 33,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица 1). Выявленные сдвиги характеризуют выраженную дезадаптацию в незнакомой обстановке у животных, подвергавшихся сочетанному воздействию в период внутриутробного развития.

По результатам теста «ПКЛ» в группе «Потомство. Жиры» выявлено достоверное снижение пройденной дистанции на 25,8 % ($p < 0,05$), общей скорости движения на 26,9 % ($p < 0,05$) и количества вертикальных стоек на 21,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении двигательной активности животных; время продолжительности актов груминга и время активности в закрытой зоне лабиринта было снижено, что указывает на высокий уровень тревожности, однако количество линий пересечения всех зон лабиринта и время, проведенное в каждой зоне, было сопоставимо с контролем, что демонстрирует сохраненную исследовательскую активность крысят (таблица 2).

Табл. 2. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» у потомства мужского пола

Показатель	Группы			
	«Потомство. Контроль»	«Потомство. Жиры»	«Потомство. ФВС»	«Потомство. Жиры + ФВС»
Общая пройденная дистанция, м	7,63 (4,94;9,47)	5,66 (3,17;7,91) *	5,18 (2,31;6,77) *	5,48 (3,23;8,38) *
Средняя скорость движения, м/с	0,026 (0,016;0,032)	0,019 (0,011;0,027) *	0,017 (0,008;0,023) *	0,019 (0,011;0,028) *
Количество вертикальных стоек	19,00 (14,00;23,00)	15,00 (11,00;21,50) *	13,00 (7,00;19,00) *	16,50 (11,00;23,00)
Количество линий пересечения всех зон лабиринта	28,50 (15,00;38,00)	25,50 (11,00;37,00)	8,00 (3,00;20,00) *#	13,50 (10,00;27,00) *#

Продолжение таблицы 2

Общее время груминга, с	27,35 (13,90;45,90)	14,65 (4,50;26,35) * ^о	33,30 (13,30;83,50)	16,75 (5,50;29,20) * ^о
Время нахождения в центральной зоне, с	36,85 (21,80;52,50)	35,70 (13,10;61,85)	9,50 (6,70;21,60) * [#]	23,55 (10,40;46,70) * ^{#о}
Количество выходов в открытую зону	5,50 (3,00;10,00)	5,00 (2,50;8,00)	2,00 (1,00;4,00) * [#]	3,00 (1,00;5,00) * [#]
Время нахождения в открытой зоне, с	12,25 (7,20;35,50)	10,60 (2,70;19,75)	2,50 (0,70;8,50) * [#]	7,70 (0,60;16,90) *
Время нахождения в закрытой зоне, с	242,40 (210,00;270,80)	245,65 (220,25;283,55)	280,50 (270,00;293,20) * [#]	269,35 (241,60;283,10) * ^о
Время активности в закрытой зоне, с	127,75 (103,00;142,10)	112,85 (78,45;123,40) * ^о	143,50 (82,50;178,30)	106,90 (80,70;126,50) * ^о
Время неподвижности в закрытой зоне, с	143,90 (108,90;203,3)	155,75 (130,05;236,00)	211,30 (175,90;244,90) * [#]	200,00 (152,80;225,50) *
Время замирания в закрытой зоне, с	54,40 (27,70;90,80)	53,50 (30,10;111,00)	100,10 (50,30;142,40) *	98,65 (54,40;177,90) * [#]

Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от «Потомство. Контроль», # – от «Потомство. Жиры», ° – от «Потомство. ФВС»

При проведении теста «ПКЛ» у крыс с ФВС зафиксировано статистически значимое уменьшение пройденной дистанции на 32,1 % ($p < 0,05$), скорости передвижения на 34,6 % ($p < 0,05$) и количества вертикальных стоек на 31,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о торможении двигательной активности; снижение исследовательской активности и высокий уровень тревожности отмечали по фактам уменьшения количества пересечений всех зон лабиринта на 71,9 % ($p < 0,05$), увеличения времени нахождения в закрытых зонах на 15,7 % ($p < 0,05$), снижения количества выходов и времени пребывания в открытых зонах ПКЛ; на высокий уровень тревожности также указывало увеличение времени неподвижности на 46,8 % ($p < 0,05$) и замирания на 84,0 % ($p < 0,05$) в закрытой «безопасной» зоне лабиринта по сравнению с контролем (таблица 2) [12, 13].

При прохождении теста «ПКЛ» у крыс из группы сочетанного воздействия выявлено нарушение двигательной и исследовательской активности, а также отмечен высокий уровень тревожности. Зафиксировано снижение пройденной дистанции на 28,2 % и скорости движения по лабиринту на 26,9 % ($p < 0,05$), уменьшение на 52,6 % ($p < 0,05$) количества линий пересечения лабиринта, увеличение времени, проведенного в закрытых зонах, и его снижение в центральной и открытых зонах лабиринта на 36,1 % ($p < 0,05$) и 37,1 % ($p < 0,05$), уменьшение общего времени актов груминга на 38,8 % ($p < 0,05$), снижение времени активности на 16,3 % ($p < 0,05$) и увеличение времени неподвижности на 39,0 % ($p < 0,05$) и замирания на 81,3 % ($p < 0,05$) в закрытой зоне ПКЛ по отношению к крысам «Потомство. Контроль» (таблица 2).

Учитывая многочисленные поведенческие отклонения у потомства крыс с различными вариантами влияния на фетальное развитие, было проведено изучение содержания в сыворотке крови нейротрофического фактора мозга BDNF. Как показано на рисунке 1, у крыс всех опытных групп концентрация BDNF в сыворотке крови была статистически значимо снижена по отношению к контролю: у животных из группы «Потомство. Жиры» данный показатель был снижен на 15,2 % ($p < 0,05$), у крыс из группы «Потомство. ФВС» – на 16,2 % ($p < 0,05$), а из группы сочетанного воздействия «Потомство. Жиры+ФВС» – на 42,4 % ($p < 0,05$).

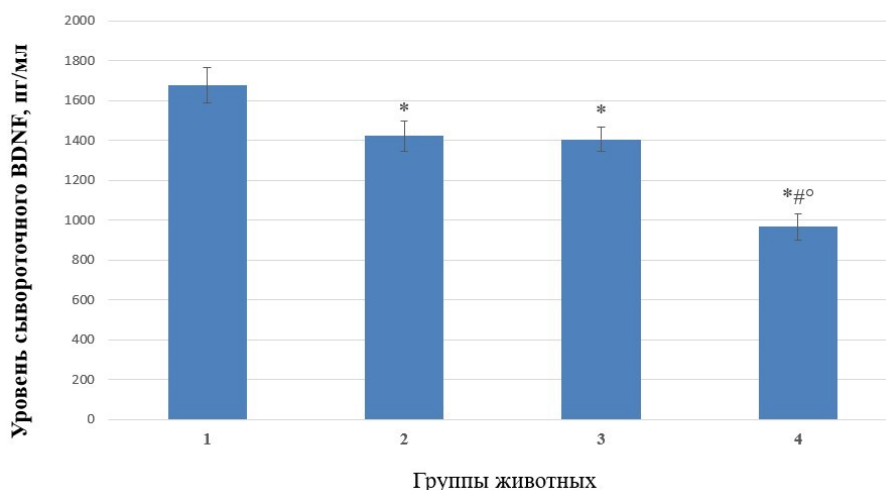


Рис. Уровень BDNF в сыворотке крови у крыс-самцов всех экспериментальных групп ($M \pm SEM$): 1 – «Потомство. Контроль», 2 – «Потомство. Жиры», 3 – «Потомство. ФВС», 4 – «Потомство. Жиры+ФВС». Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы контроля, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «Потомство. Жиры», ° – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «Потомство. ФВС»

Необходимо отметить, что уровень BDNF у самцов из группы сочетанного воздействия был снижен относительно групп «Потомство. ФВС» на 31,2 % ($p < 0,05$) и «Потомство. Жиры» на 32,0 % ($p < 0,05$; рисунок).

BDNF является членом семейства нейротрофинов, играющим важную роль в созревании центральной нервной системы и поддержании ее функционирования. Данный белок участвует в процессах нейрогенеза, дифференцировки нейронов, синаптогенеза и синаптической пластичности [14]. Поскольку нейротрофический фактор мозга по современным данным вовлечен в патогенетические механизмы развития различных психоневрологических заболеваний [14, 15], можно предположить, что нарушения поведенческих реакций в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» могут быть связаны со снижением уровня исследуемого нейротрофина.

Заключение. Изучение поведенческих реакций крыс-самцов в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», а также определение уровня нейротрофического фактора мозга BDNF в сыворотке крови позволяет сделать следующие выводы:

1) потребление ВЖД самками крыс приводит к появлению у их потомства признаков повышенной тревожности и сниженной двигательной активности на фоне сохраненной исследовательской активности;

2) потомство с индуцированным ФВС характеризуется выраженным тревожным поведением, зафиксированным по многим показателям, а также сниженной исследовательской и двигательной активностью;

3) сочетанное фетальное воздействие (ВЖД+ФВС) вызывает суммирование поведенческих отклонений: нарушение адаптационных реакций, снижение горизонтальной двигательной и исследовательской активности, а также высокий уровень тревожности у животных;

4) определение содержания BDNF в сыворотке крови потомства всех опытных групп демонстрирует статистически значимое снижение этого показателя, наиболее выраженное в группе сочетанного воздействия («Потомство. Жиры+ФВС»).

Таким образом, применение ВЖД у самок крыс приводит к развитию у их потомства поведенческих отклонений, связанных с высоким уровнем тревожности при адаптации к новым условиям среды, но уступающим по характеру и выраженности дезадаптивным сдвигам при индуцированном ФВС. Сочетанное воздействие ВЖД и ФВС вызывает суммирование ряда негативных последствий. Предположительно, одним из механизмов неблагоприятного фетального программирования является снижение нейротрофической обеспеченности головного мозга у потомства, за счет снижения уровня BDNF.

Литература:

- [1] *Moreno-Fernandez J., Ochoa J.J., Lopez-Frias M. et al.* Impact of early nutrition, physical activity and sleep on the fetal programming of disease in the pregnancy: a narrative review // *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 12. Art. 3900. P. 1–18.
- [2] *Петров Ю.А., Купина А.Д.* Фетальное программирование – способ предупреждения заболеваний во взрослом возрасте // *Медицинский совет*. 2020. Т. 13. С. 50–56.
- [3] *Marciniak A., Patro-Małysza J., Kimber-Trojnar Ż. et al.* Fetal programming of the metabolic syndrome // *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017. Vol. 56, № 2. P. 133–138.
- [4] *Panjwani A.A., Ji Y., Fahey J.W et al.* Maternal obesity/diabetes, plasma branched-chain amino acids, and autism spectrum disorder risk in urban low-income children: Evidence of sex difference // *Autism Research*. 2019. Vol. 12, № 10. P. 1562–1573.
- [5] *Urbonaite G., Knyzeliene A., Bunn F.S. et al.* The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment // *Frontiers in neuroscience*. 2022. Vol. 16. Art. 909762. P. 1–24.
- [6] *Nicolini C., Fahnestock M.* The valproic acid-induced rodent model of autism // *Experimental neurology*. 2018. Vol. 299, Part A. P. 217–227.
- [7] European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg. 1986. 52 p.
- [8] *Ruhela R.K., Sarma P., Soni S. et al.* Congenital malformation and autism spectrum disorder: Insight from a rat model of autism spectrum disorder // *Indian J Pharmacol*. 2017. Vol. 49, № 3. P. 243–249.
- [9] *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- [10] *Майоров О.Ю.* Оценка индивидуально-типологических особенностей поведения и устойчивости интактных белых крыс-самцов на основе факторной модели нормального этологического спектра показателей в тесте «открытое поле» // *Клин. информат. и Телемед*. 2011. Т. 7, вып. 8. С. 21–32.
- [11] *Пермяков А.А., Елисеева Е.В., Юдицкий А.Д. и др.* Поведенческие реакции у экспериментальных животных с различной прогностической устойчивостью к стрессу в тесте «Открытое поле» // *Вестник Удмуртского университета*. 2013. № 3. С. 83–89.
- [12] *Wang X., Tao J., Qiao Y. et al.* Gastrodin rescues autistic-like phenotypes in valproic acid-induced animal model // *Frontiers in Neurology*. 2018. Vol. 9. Art. 1052. P. 1–10.
- [13] *Khodaverdi M., Rahdar M., Davoudi S. et al.* 5-HT₇ receptor activation rescues impaired synaptic plasticity in an autistic-like rat model induced by prenatal VPA exposure // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2021. Vol. 183. Art. 107462. P. 1–43.
- [14] *Ferraguti G., Terracina S., Micangeli G. et al.* NGF and BDNF in pediatrics syndromes // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2023. Vol. 145. Art. 105015.
- [15] *Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F.* Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21. Art. 7777. P. 1–29.

A. A. BASALAI

EFFECT OF HIGH-FAT DIET OF FEMALE WISTAR RATS ON BEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF THEIR MALE OFFSPRING

State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus

Summary

The effects of a high-fat diet (HFD) in female rats on behavioral characteristics and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in male offspring were investigated in comparison with the effects of fetal valproate syndrome (FVS), which is a well-established model of nervous system dysfunction. It has been shown that the consumption of HFD by female rats leads to signs of increased anxiety and decreased motor activity in male offspring. Offspring with FVS are characterized by marked anxious behavior, decreased exploratory and motor activity. The combined effects of HFD and FVS cause the summation of a number of negative consequences. Determination of BDNF in the blood serum of offspring of all experimental groups demonstrates a decrease in the level of this protein, most pronounced in the group of combined effect.

Key words: high-fat diet, fetal valproate syndrome, fetal programming, behavioral reactions, brain-derived neurotrophic factor.

УДК 616.127-005.4-092.4:612.8.04:616-092

Ф. И. ВИСМОНТ¹, С. Н. ЧЕПЕЛЕВ¹, С. В. ГУБКИН², П. Ф. ЮШКЕВИЧ¹, Е. Н. ЧЕПЕЛЕВА¹
**О ЗНАЧИМОСТИ АКТИВНОСТИ М-ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ
В РЕАЛИЗАЦИИ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА
ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА ПРИ
ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС**

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь;

² Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии
наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Разработка новых способов защиты миокарда при ишемически-реперфузионном повреждении, а также выяснение механизмов их реализации является актуальной задачей современной экспериментальной медицины. Целью исследования явилось выяснение значимости активности М-холинореактивных систем (М-ХРС) в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта посткондиционирования с помощью L-лактата (ПостЛ) при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс. В результате проведенного исследования установлено, что в условиях действия в организме животных атропина (2 мг/кг) инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ сохраняется у старых, но не у молодых крыс. Полученные данные дают основания полагать о том, что активность М-ХРС имеет значение в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых, но не у старых крыс.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, инфаркт-лимитирующий эффект, посткондиционирование, L-лактат, атропин, М-холинореактивные системы, возраст.

Введение. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является основной причиной смертности и инвалидности от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) во всем мире и представляет собой глобальную социально-экономическую проблему в сфере общественного здоровья населения. Одним из наиболее серьезных осложнений ИБС является острый инфаркт миокарда (ОИМ) [1].

Реперфузия является обязательным условием для спасения ишемизированного миокарда от инфаркта, но в то же время способствует формированию необратимого повреждения сердца. Размер зоны некроза в миокарде, возникающий в результате повреждения, вызванного как ишемией, так и реперфузией, является основным фактором, определяющим прогноз пациентов, перенесших ОИМ. Принимая во внимание, что все большее число пациентов выживает после ОИМ в основном благодаря своевременной реперфузии и лучшему медикаментозному лечению и что многие из этих пациентов имеют прогрессирующее ремоделирование миокарда и, в конечном итоге, сердечную недостаточность, существует необходимость в дополнительной кардиопротекции помимо реперфузии с целью минимизации размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка, как основной детерминанты развивающейся сердечной недостаточности [2]. По литературным данным, в настоящее время нет более сильной кардиопротекции, чем за счет феноменов кондиционирования миокарда, которые изучаются на протяжении последних трех десятилетий [2–7]. Однако, несмотря на достигнутые успехи в изучении методов кардиопротекции и ее механизмов, в настоящее время общая концепция защиты миокарда остается не сформированной [2, 7].

Авторами в ранее проведенном исследовании было показано, что после 15-минутной ишемии обеих нижних конечностей у крыс, что характерно для модели дистантного ишемического посткондиционирования (ДИПост), повышается уровень L-лактата в крови в 2,28 раза ($p < 0,001$) с 1,55 (1,47; 1,92) ммоль/л до 3,54 (3,35; 3,69) ммоль/л, а выполнение посткондиционирования с помощью L-лактата (ПостЛ) путем введения нейтрального L-лактата на 25-й мин реперфузии в дозе 10 мг/кг приводит к снижению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 28,2 % ($p < 0,01$), то есть ослабляется реперфузионное повреждение сердца [8, 9].

В практическом здравоохранении потребность в защите миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения чаще всего необходима пациентам с различными факторами риска ССЗ, к числу которых относится и пожилой возраст [10, 11].

Данные многочисленных научных исследований свидетельствуют о важном значении парасимпатической регуляции сердечной деятельности в механизмах защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждений [12–14]. Известно, что процессы старения организма сопровождаются ослаблением влияния парасимпатической регуляции на сердце, что связано с деструкцией холинергических нервных окончаний, снижением интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и числа М-холинорецепторов в миокарде [15, 16].

Принимая во внимание тот факт, что в организме старых животных происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения [10, 11, 15, 16], были основания полагать, что возрастные изменения органов и тканей и, в частности, изменения в них активности периферических М-холинореактивных систем (М-ХРС), могут сказываться на кардиопротекторной эффективности ПостЛ.

Цель исследования – выяснить значимость активности М-ХРС в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 96 наркотизированных белых крысах-самцах (48 молодых крыс, возраст которых составил 3–5 мес., а масса – 200–220 г и 48 старых крыс, возраст которых составил 23–25 мес., а масса – 400–450 г). С целью выяснения значимости активности М-ХРС в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда на молодых и старых крысах были проведены следующие эксперименты, схематические изображения протоколов которых представлены на рисунке 1.

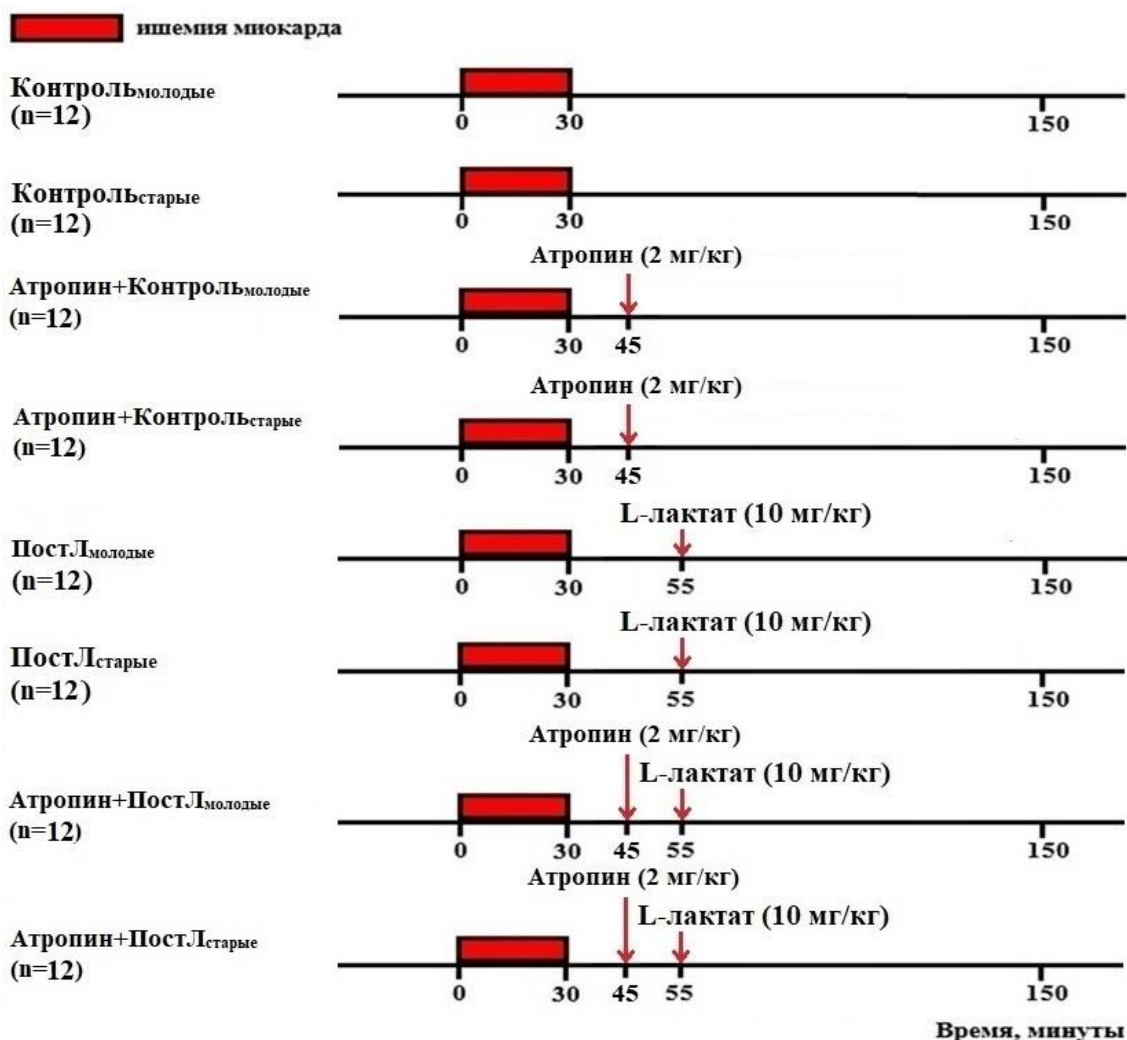


Рис. 1. Дизайн исследования: экспериментальные группы для выяснения кардиопротекторной эффективности ПостЛ у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина

Эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными (протокол № 1 от 15.09.2022 комитета по биомедицинской этике

Белорусского государственного медицинского университета). Животные содержались в стандартных условиях вивария Белорусского государственного медицинского университета с свободным доступом к пище и воде. Все болезненные процедуры выполняли на наркотизированных животных. Для наркотизации животных применяли тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией в левую общую яремную вену поддерживающей дозы 10 мг/кг/час с помощью инъекционного насоса В. Braun (Германия). Адекватность выполненной общей анестезии оценивалась по отсутствию рефлекторного отдергивания задней конечности животного на укол. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата искусственной вентиляции легких Harvard Rodent Ventilator (model 683) (Harvard, США) с частотой дыхания 56–60 в мин. В ходе экспериментов постоянно регистрировались электрокардиограмма (ЭКГ) во II стандартном отведении при помощи электрокардиографа (Harvard Apparatus, США) с использованием игольчатых электродов, помещаемых подкожно на конечности, и системное артериальное давление (АД). Для измерения АД прямым методом крысам канюлировали правую общую сонную артерию катетером, соединенным с электроманометром. Доступ к трахее и сонной артерии осуществлялся через срединный разрез кожи на шее с последующим тупым разделением тканей пинцетами. Ректальная температура у крыс измерялась электротермометром (Harvard Apparatus, США) и поддерживалась электрогрелкой на уровне $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Полученные при выполнении исследования данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Spike 4 (Великобритания).

Доступ к сердцу осуществлялся путем торакотомии через IV межреберье. После осуществления торакотомии производилась визуализация сердца. Далее, тупым способом, с помощью браншей анатомических пинцетов удалялся перикард. На границе свободного края ушка левого предсердия визуализировалась левая коронарная артерия (ЛКА), под переднюю нисходящую ветвь которой подводилась лигатура (пролен 6/0, Ethicon, Германия). Передняя нисходящая ветвь ЛКА у крыс является основным сосудом кровоснабжения передней стенки левого желудочка, межжелудочковой перегородки и передней боковой стенки левого желудочка, лигирование которой является наиболее часто используемым методом в изучении инфаркта миокарда [17].

Воспроизведение обратимой окклюзии передней нисходящей ветви ЛКА осуществлялось в несколько этапов: подведение лигатуры под переднюю нисходящую ветвь ЛКА, отрезание атрауматической иглы; два свободных конца лигатуры проводились через полиэтиленовую трубку малого диаметра; натяжение концов нитки с последующей их фиксацией с помощью наложения зажима на полиэтиленовую трубку; при реперфузии осуществлялось снятие зажима. После 15-минутного периода гемодинамической стабилизации крысам выполнялась 30-минутная окклюзия передней нисходящей ветви ЛКА. Окклюзия артерии проявлялась побледнением ишемизированной области, снижением АД (на 10–30 мм рт. ст.) и подъемом сегмента ST на ЭКГ. Реперфузия миокарда осуществлялась путем удаления зажима с ЛКА. Продолжительность реперфузии составляла 120 мин. Реперфузия миокарда подтверждалась возвращением сегмента ST к изолинии и исчезновением побледнения.

В ходе выполнения экспериментов у животных изучались следующие показатели гемодинамики: $\text{АД}_{\text{ср}}$ (мм рт. ст.) и ЧСС (уд/мин). $\text{АД}_{\text{ср}}$ рассчитывали, как $\text{АД диастолическое} + 1/3 (\text{АД систолическое} - \text{АД диастолическое})$. Показатели гемодинамики регистрировались непрерывно в течение эксперимента и оценивались в конце 15-минутной стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки, в начале 30-минутной окклюзии передней нисходящей ветви ЛКА, в начале реперфузии миокарда, а также каждые 30 мин в течение периода реперфузии. Значения гемодинамических показателей в конце 15-минутной стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки принимались в качестве исходных значений данных показателей.

Во время ишемии-реперфузии миокарда подсчитывалась общая длительность нарушений сердечного ритма. При этом у крыс регистрировались следующие нарушения сердечного ритма: фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальные желудочковые тахикардии (ПЖТ), парные желудочковые экстрасистолы, желудочковые экстрасистолы по типу бигеминии.

Выяснение инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у крыс проводилось у животных, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую внутреннюю яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора L-молочной кислоты (Sigma-Aldrich, США), т.е. в дозе 10 мг/кг. Крысам контрольной группы через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену физиологический раствор (физ. р-р) в объеме 0,5 мл. Для приготовления, нейтрализованного L-лактата для инъекций, L-молочную кислоту растворяли

в 0,9 %-м растворе NaCl с последующим доведением pH до 7,4 с помощью NaOH. Доза L-лактата (10 мг/кг) в модели ПостЛ была выбрана с целью обеспечить уровень L-лактата в крови, близкий к тому, что имел место после 15-минутного наложения зажимов на обе бедренные артерии, что имеет место во время дистантного ишемического посткондиционирования [8, 9].

Изучение инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии и реперфузии миокарда у старых и молодых крыс в условиях угнетения периферических М-ХРС проводилось после однократного введения в левую внутреннюю яремную вену 0,2 %-го раствора М-холиноблокатора атропина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг, которое осуществлялось за 10 мин до воспроизведения у крыс ПостЛ.

Крыс выводили из эксперимента спустя 2 ч после начала реперфузии путем иссечения сердца из грудной полости для последующего окрашивания и определения зоны риска (зоны ишемии) и зоны некроза (зоны инфаркта). С целью определения зоны риска в конце реперфузии осуществляли кратковременную реокклюзию передней нисходящей ветви ЛКА и вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 5 %-ного раствора синьки Эванса (Sigma-Aldrich, США). После замораживания в морозильной камере (-20°C в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов. Данные срезы взвешивали на лабораторных весах Adventurer AR 1530 (Ohaus, Швейцария) и сканировали при помощи сканера Epson (Китай) с обеих сторон. При этом зону риска определяли как зону, не окрашенную в синий цвет. Для идентификации зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс использовали метод, основанный на определении активности дегидрогеназ [18]. Срезы миокарда левого желудочка помещали в 1 %-й раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре $37,0^{\circ}\text{C}$ и в дальнейшем после 24-часовой инкубации срезов в 10 %-м растворе формалина в термостате при температуре $37,0^{\circ}\text{C}$ срезы сканировали повторно с обеих сторон. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была бледно-розового цвета. Размеры анализируемых зон некроза определяли при помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop CS 2013 и взвешивания срезов как соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска, выраженное в % [19].

Полученные данные анализировались с использованием программы GraphPad Prism 9.3.1. Статистическую значимость различий полученных данных при их параметрическом распределении оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони, при этом результаты представлялись в виде: среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для анализа непараметрического распределения полученных данных использовали критерий Крускала-Уоллиса и тест множественных сравнений Данна, при этом результаты были представлены в виде: медиана и квартили в виде $Me (Q25; Q75)$. Уровень $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что во всех экспериментальных группах молодых и старых крыс во время острой коронарной недостаточности имело место снижение $AD_{\text{ср}}$ ($p < 0,05$) в сравнении с его исходными значениями. В начале реперфузии в группах Контроль_{старые}, Атропин + Контроль_{старые}, ПостЛ_{старые}, Атропин + ПостЛ_{молодые} и Атропин + ПостЛ_{старые} также имело место статистически значимое снижение $AD_{\text{ср}}$ ($p < 0,05$) в сравнении с его исходными значениями. У животных, которым осуществлялось введение в левую внутреннюю яремную вену 0,2 %-го раствора М-холиноблокатора атропина в дозе 2 мг/кг на 15-й минуте реперфузии миокарда, отмечалось статистически значимое повышение ЧСС ($p < 0,01$) в сравнении с его исходными значениями на 30, 60, 90 и 120-й минутах реперфузии. Изменение показателей гемодинамики на протяжении эксперимента у старых и молодых крыс представлено в таблице 1.

Табл. 1. Изменение показателей гемодинамики во время ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс с ПостЛ и без в условиях системного действия в организме животных атропина

Показатели гемодинамики		Молодые крысы				Старые крысы			
		Контроль (n=12)	Атропин + Контроль (n=12)	ПостЛ (n=12)	Атропин + ПостЛ (n=12)	Контроль (n=12)	Атропин + Контроль (n=12)	ПостЛ (n=12)	Атропин + ПостЛ (n=12)
До начала острой ишемии миокарда	АД _{ср}	81±5	85±3	82±3	84±3	88±5	92±5	87±5	89±4
	ЧСС	415±16	416±15	410±15	415±13	448±17	430±15	439±18	435±19
Начало острой ишемии миокарда	АД _{ср}	68±4*	71±4*	69±4*	68±5*	70±5*	72±5*	71±4*	72±4*
	ЧСС	430±14	425±22	434±16	426±19	408±24	418±20	404±17	424±22
Начало реперфузии	АД _{ср}	75±5	77±5	76±4	73±3*	73±4*	79±4*	74±5*	77±4*
	ЧСС	433±23	430±20	420±23	416±17	407±31	420±30	399±35	427±18
30 мин реперфузии	АД _{ср}	77±4	79±4	75±4	75±5	76±5	81±5	77±5	78±4
	ЧСС	439±19	515±30**	424±21	495±21**	404±24	525±28**	403±29	514±24**
60 мин реперфузии	АД _{ср}	76±5	79±5	78±5	76±4	78±6	82±6	78±4	79±5
	ЧСС	432±16	523±25**	415±21	502±20**	398±23	533±21**	406±21	521±23**
90 мин реперфузии	АД _{ср}	78±4	81±4	78±4	77±5	78±5	82±4	80±4	81±4
	ЧСС	420±16	515±24**	417±18	491±17**	393±25	519±25**	416±24	512±20**
120 мин реперфузии	АД _{ср}	80±5	81±5	80±3	81±4	79±5	84±6	81±5	83±3
	ЧСС	413±17	505±25**	420±17	484±22**	387±25	515±21**	421±21	503±19**

Примечание: */** – $p < 0,05/p < 0,01$ – различия статистически значимы в сравнении с исходными значения

В ходе исследования выявлено, что в группе Контроль_{молодые} у 9 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а у 11 животных – ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 10 крыс данной группы. В группе Контроль_{старые} в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечались ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались также у 11 животных данной группы. В ходе исследования также установлено, что в группе Атропин + Контроль_{молодые} у 11 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а у 10 животных данной группы была выявлена ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 11 крыс данной группы. В группе Атропин + Контроль_{старые} в период острой коронарной окклюзии у 12 крыс отмечались ФЖ, а у 10 – ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались также у 11 животных данной группы. В группе ПостЛ_{молодые} в период острой коронарной окклюзии у 9 из 12 крыс отмечалась ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма отмечались у 7 животных данной группы. В группе ПостЛ_{старые} в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ – у 10 крыс. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 8 животных данной группы. В группе Атропин + ПостЛ_{молодые} в период 30-минутной ишемии миокарда ФЖ и ПЖТ были выявлены у 11 из 12 животных. Реперфузионные аритмии имели место у 10 животных данной группы. В группе Атропин + ПостЛ_{старые} в период острой коронарной недостаточности у 11 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а у 10 – ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма имели место у 12 животных данной группы.

При изучении антиаритмической эффективности ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина (2 мг/кг) были получены следующие данные по продолжительности аритмий: Контроль_{молодые} – 167 (49;233) с, Контроль_{старые} – 237 (128;331) с, Атропин + Контроль_{молодые} – 176 (91;214) с, Атропин + Контроль_{старые} – 164 (89;275) с, ПостЛ_{молодые} – 145 (27;192) с; ПостЛ_{старые} – 97 (66;154) с; Атропин + ПостЛ_{молодые} – 182 (54;258) с и Атропин+ПостЛ_{старые} – 192 (77;314) с (рисунок 2).

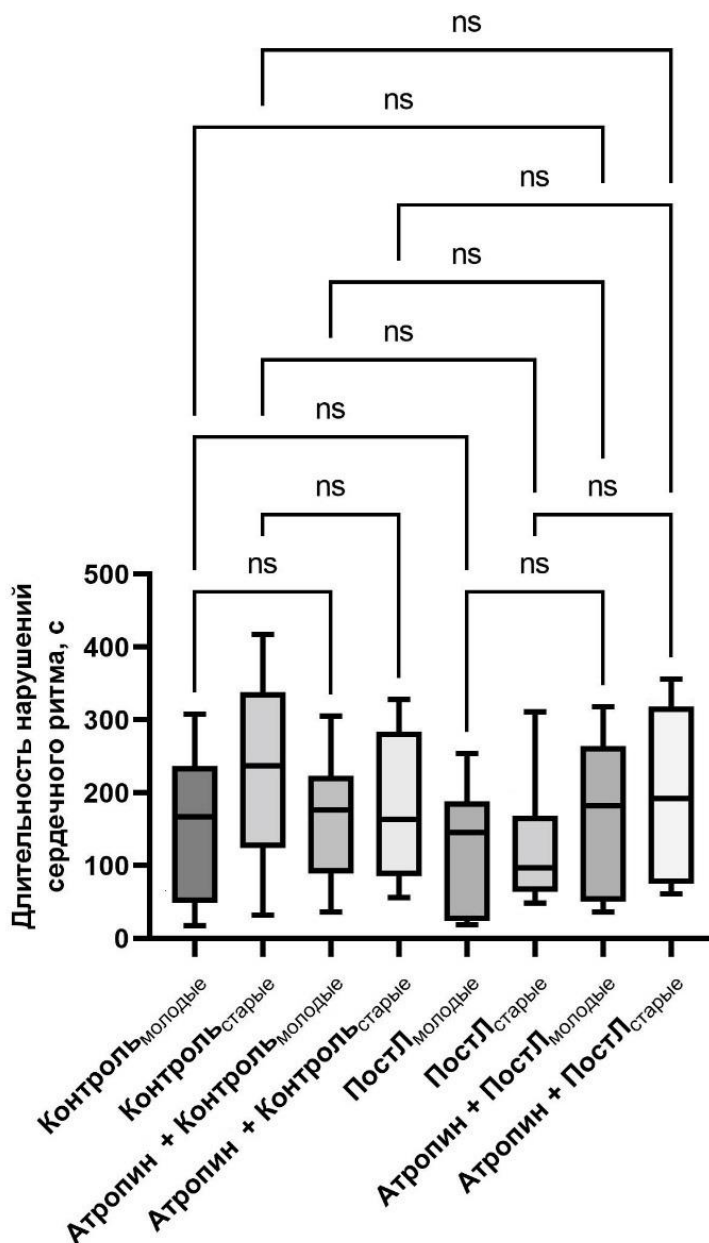


Рис. 2. Влияние ПостЛ на длительность нарушений сердечного ритма во время ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных атропина (2 мг/кг). ns – различия не достоверны

Таким образом, длительность нарушений сердечного ритма в исследуемых группах молодых и старых крыс, подвергнутых атропинизации и ПостЛ, сопоставима с таковой в группах контроля ($p > 0,05$).

При изучении кардиопротекторной эффективности ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина статистически значимых различий между анализируемыми группами по показателю размера зоны риска (зоны ишемии) в миокарде левого желудочка не выявлено. Так, зона ишемии в группе Контроль_молодые составила $54 \pm 3 \%$, Контроль_старые – $55 \pm 3 \%$, Атропин + Контроль_молодые – $49 \pm 5 \%$, Атропин + Контроль_старые – $53 \pm 6 \%$, ПостЛ_молодые – $52 \pm 4 \%$, ПостЛ_старые – $53 \pm 3 \%$, Атропин + ПостЛ_молодые – $50 \pm 4 \%$ и Атропин + ПостЛ_старые – $54 \pm 5 \%$. Таким образом, во всех анализируемых группах крыс размеры зон риска в миокарде левого желудочка были сопоставимы.

Размер инфаркта является важным показателем повреждения миокарда из-за его влияния на сократимость сердца. Установлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у

животных в группе Контроль_{молодые} составил 45 ± 4 %, а в группе Контроль_{старые} – 47 ± 5 %. В контрольных группах крыс, которым осуществлялось введение на 15-й минуте реперфузии блокатора М-ХРС атропина в дозе 2 мг/кг, формировались следующие размеры зон некроза: в группе Атропин + Контроль_{молодые} – 47 ± 5 %, а в группе Атропин + Контроль_{старые} – 48 ± 7 %. После внутривенного введения животным L-лактата (10 мг/кг), которое осуществлялось через 25 мин после начала реперфузии, у крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались следующие размеры зон некроза: в группе ПостЛ_{молодые} – 33 ± 3 % ($p < 0,01$ в сравнении с группами Контроль_{молодые} и Атропин + Контроль_{молодые}), а в группе ПостЛ_{старые} – 35 ± 4 % ($p < 0,01$ в сравнении с группами Контроль_{старые} и Атропин + Контроль_{старые}). Размер зон некроза в группах молодых и старых животных, которым на 15-й минуте реперфузии вводили блокатор М-ХРС атропин (2 мг/кг), а затем внутривенно вводили L-лактат, был следующим: в группе Атропин + ПостЛ_{молодые} – 41 ± 4 %, а в группе Атропин + ПостЛ_{старые} – 32 ± 4 % ($p < 0,01$ в сравнении с группами Контроль_{старые} и Атропин + Контроль_{старые}) (рисунок 3).

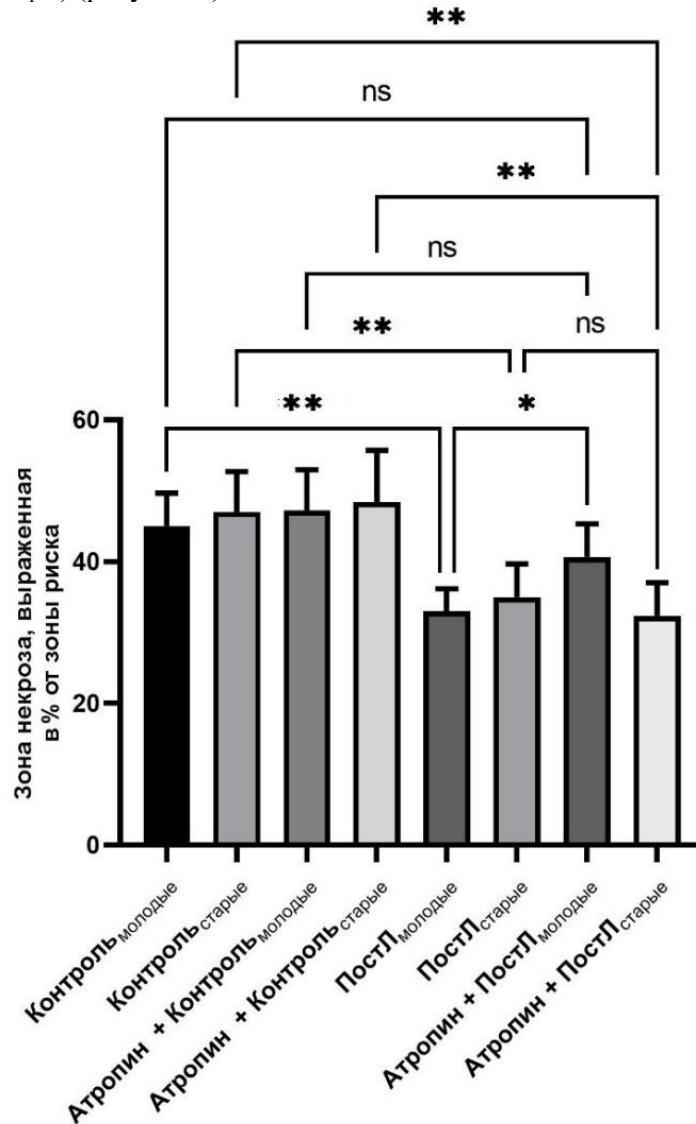


Рис. 3. Влияние ПостЛ на размеры зон некроза в миокарде левого желудочка во время ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных атропина (2 мг/кг). * / ** – $p < 0,05$ / $p < 0,01$ – различия статистически значимы; ns – различия не достоверны

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о наличии выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых и старых крыс. Однако в условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина (2 мг/кг) у молодых крыс ПостЛ оказывало менее выраженный инфаркт-лимитирующий эффект. У старых животных в условиях системного действия в их организме атропина инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ сохранялся.

Таким образом, данные выполненных исследований дают основания заключить, что активность периферических М-ХРС имеет значение в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых, но не у старых крыс. Такое заключение согласуется с имеющимися литературными данными о том, что у старых крыс имеет место выраженное снижение интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и активности ацетилхолинтрансферазы [15, 16], свидетельствующее о нарушении процессов холинергической регуляции сердечной деятельности у таких животных.

Заключение. ПостЛ оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс. В условиях системного действия в организме животных атропина инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ сохраняется только у старых крыс. По-видимому, активность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых, но не у старых крыс, что позволяет говорить о необходимости дифференцированного подхода к применению ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда в молодом и пожилом возрасте.

Литература:

- [1] *Островский Ю.П., Гореликов А.В., Карпелёв Г.М.* Ишемическое посткондиционирование миокарда. Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние мед. наук. Минск: Беларуская навука, 2021. 171 с.
- [2] *Heusch G.* Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning // *Circulation Research*. 2015. Vol. 116, № 4. P. 674–699. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.
- [3] *Баутин А.Е., Карпова Л.И., Маричев А.О. и др.* Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация // *Трансляционная медицина*. 2016. Т. 3, № 1. С. 50–62.
- [4] *Roth S., Torregroza C., Feige K. et al.* Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 5. Article ID 2519. P. 1–19. DOI: 10.3390/ijms22052519.
- [5] *Donato M., Evelson P., Gelpi R.J.* Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning // *Current Opinion in Cardiology*. 2017. Vol. 32, No 6. P. 784–90. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000447.
- [6] *Маслов Л.Н., Подоксёнов А.Ю., Халиулин И.Г.* Феномен ишемического посткондиционирования сердца. Анализ клинических данных // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2017. Т. 23, № 1. С. 21–28.
- [7] *Basalay M., Barsukevich V., Mastitskaya S. et al.* Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms // *Experimental Physiology*. 2012. Vol. 97, № 8. P. 908–917. DOI: 0.1113/expphysiol.2012.064923.
- [8] *Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И.* Инфаркт-лимитирующая эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте // *Медицинский журнал*. 2021. № 1 (75). С. 104–109.
- [9] *Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И., Губкин С.В.* О значимости гиперлактатемии в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте // *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2020. Т. 64, № 3. С. 332–340. DOI: 10.29235/1561-8323-2020-64-3-332-340.
- [10] *Fajemiroye J.O., da Cunha L.C., Saavedra-Rodríguez R. et al.* Aging-Induced Biological Changes and Cardiovascular Diseases // *BioMed Research International*. 2018. Vol. 2018. Art. ID 7156435. P. 1–14. DOI: 10.1155/2018/7156435.
- [11] *Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G.F.* Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning // *Pharmacological Reviews*. 2007. Vol. 59, № 4. P. 418–458. DOI: 10.1124/pr.107.06002.
- [12] *Donato M., Buchholz B., Rodríguez M. et al.* Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning // *Experimental Physiology*. 2013. Vol. 98, № 2. P. 425–434. DOI: 10.1113/expphysiol.2012.066217.
- [13] *Gourine A., Gourine A.V.* Neural mechanisms of cardioprotection // *Physiology (Bethesda)*. 2014. Vol. 29, № 2. P. 133–140. DOI: 10.1152/physiol.00037.2013.
- [14] *Mastitskaya S., Marina N., Gourine A. et al.* Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones // *Cardiovascular Research*. 2012. Vol. 95, № 4. P. 487–494. DOI: 10.1093/cvr/cvs212.
- [15] *Freeling J.L., Li Y.* Age-related attenuation of parasympathetic control of the heart in mice // *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2015. Vol. 7, № 3. P. 126–135.
- [16] *Rana O.R., Schauerte P., Kluttig R. et al.* Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart // *Autonomic Neuroscience*. 2010. Vol. 156, № 1–2. P. 82–89. DOI: 10.1016/j.autneu.2010.04.011.

- [17] Карпов А.А., Ивкин Д.Ю., Драчева А.В. и др. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки // Биомедицина. 2014. № 3. С. 32–48.
- [18] Fishbein M.C., Meerbaum S., Rit J. et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique // American Heart Journal. 1981. Vol. 101, No 5. P. 593–600. DOI: 10.1016/0002-8703(81)90226-x.
- [19] Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И. О значимости монооксида азота в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2020. Т. 17, № 3. С. 353–364. DOI: 10.29235/1814-6023-2020-17-3-353-363.

F. I. VISMONT¹, S. N. CHEPELEV¹, S. V. GOUBKIN², P. F. JUSHKEVICH¹, E. N. CHEPELEVA¹

ON THE SIGNIFICANCE OF THE ACTIVITY OF M-CHOLINOREACTIVE SYSTEMS IN THE IMPLEMENTATION OF THE INFARCTION-LIMITING EFFECT OF POSTCONDITIONING WITH L-LACTATE IN MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN YOUNG AND OLD RATS

¹ Educational Institution “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;

² State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

The development of new methods of protecting the myocardium during ischemia-reperfusion injury, as well as elucidation of the mechanisms for their implementation, is an urgent task of modern experimental medicine. The purpose of the study was to determine the significance of the activity of M-cholinoreactive systems (M-CRS) in the implementation of the infarct-limiting effect of postconditioning with L-lactate (PostL) during myocardial ischemia-reperfusion in young and old rats. As a result of the study, it was established that under conditions of exposure to atropine (2 mg/kg) in animals, the heart attack-limiting effect of PostL persists in old, but not in young rats. The data obtained give reason to believe that M-CRS activity is important in the implementation of the infarct-limiting effect of PostL in young, but not in old rats.

Key words: ischemia, reperfusion, infarct-limiting effect, postconditioning, L-lactate, atropine, M-cholinoreactive systems, age.

УДК: 616-006.487-08:[616-097.1:597.321

Д. В. ЛУЦКОВИЧ¹, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА², М. А. КОРНЕЕВА², А. В. КЛЫЧ¹,
С. В. МАНЬКОВСКАЯ², А. Н. МЕЛЕШКО¹

СИНГЕННАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии, иммунологии и иммунологии», Боровляны, Республика Беларусь

² Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Целью исследования было создание сингенной модели нейробластомы (НБ) с возможностью таргетирования *GD2* и *B7H3*. В экспериментах мышам линии A/J (12 самцов и 12 самок) проводили подкожное введение трансгенных вариантов *GD2+* клеточной линии мышинной нейробластомы *NXS2* в количестве 1,5 и 2 млн. клеток, а также 1,5 млн. клеток *NXS2*, трансдуцированных геном человеческого белка *hB7H3*. Для оценки динамики роста раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера, производили прижизненную съемку на визуализаторе люминисценции *IVIS*, проведена гистологическая оценка первичного очага опухоли. Полученная модель мышинной нейробластомы пригодна для экспериментального лечения, подразумевающего таргетирование мишеней *GD2* и *B7H3*.

Ключевые слова: нейробластома, сингенная модель, лентивирусная трансдукция.

Введение. Оценка эффективности и безопасности фармакологических средств, а также новых методов лечения невозможна без воспроизводимых экспериментальных моделей *in vivo*, обеспечивающих приемлемую предсказуемость результатов доклинических испытаний для дальнейших клинических исследований. На сегодняшний день в экспериментальной онкологии преимущественно используют мышинные модели, которые представлены следующими вариантами: по локализации – подкожные, внутрибрюшинные, ортотопические (в месте первоначального развития); по источнику опухоли – спонтанные, сингенные (с использованием мышинной клеточной линии), ксенографтные (имплантация культуры опухолевых клеток человека иммунодефицитным мышам) [1]. Сингенные модели наиболее доступные и удобные для экспериментальных работ. Они позволяют не только провести первичную оценку эффективности фармакологических свойств исследуемых агентов, но и тестировать новые подходы к локальному лечению онкозаболевания, изучать взаимодействие опухоли с микроокружением, её биологию роста.

Нейробластома (НБ) – самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей. На долю нейробластомы приходится 8–10 % всех педиатрических онкологических заболеваний. Частота встречаемости составляет 0,9–1,1 случая на 100 000 детей в возрасте 0–14 лет [2, 3]. Лечение пациентов с нейробластомой высокой группы риска продолжает оставаться серьезной проблемой; в этой группе 5-летняя выживаемость составляет около 38–45 % [4]. Характерными поверхностными маркерами нейробластомы являются дисаialogанглиозид *GD2* и белок *B7H3* [5, 6].

Целью данной работы явилось создание сингенной модели нейробластомы с возможностью таргетирования *GD2* и *B7H3*.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на самках ($n=15$) и самцах ($n=15$) мышей линии A/J в возрасте 6–8 недель, содержащихся в условиях конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларуси. Все мыши ($n=30$) содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище и циклом день/ночь 12/12 ч. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол №1 от 02 февраля 2022 г.).

Ген фермента биолюминесценции люцефифразы светлячка (*Luc*) был клонирован из плазмиды *pT7luc* (получена из коллекции Института микробиологии НАН Беларуси) в лентивирусный вектор *pUltra* во втором положении после зеленого флуоресцентного белка (от англ. Green Fluorescent Protein; *GFP*) через 2-А пептид по сайтам рестрикции *BamHI*:*Sall*.

Полноразмерная кДНК длинной изоформы *4Ig* гена *B7-H3* (CD276) была амплифицирована из общей кДНК образца нейробластомы и клонирована в вектор *pWPXL* по сайтам *BamHI*:*EcoRI* (рис. 1).

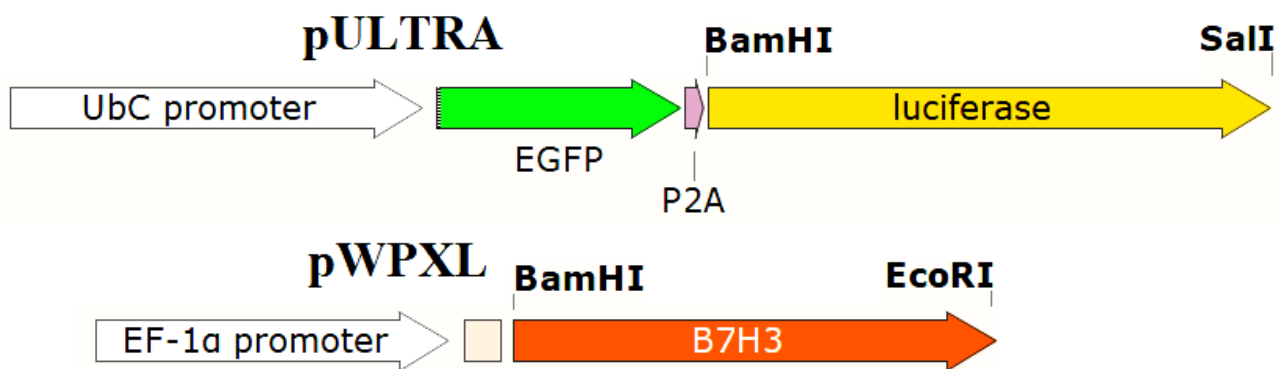


Рис. 1. Лентивирусные вектора pUltra с экспрессионной касетой GFP - Luc и pWPXL с B7-H3

GD2+клеточная линия мышиной нейробластомы NXS2 предоставлена проф. Лоде (Грейфсвальд, Германия) [7]. Клетки NXS2 культивировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 1 % антибиотика/антимикотика. Опухолевые клетки NXS2 были трансдуцированы концентрированными лентивирусными частицами, содержащими высокий титр VSVG-псевдотипированных *pUltra_GFP-Luc* и *pUltra_B7H3* с добавлением 6 мкг/мл полибрена. Псевдотипированные лентивирусные частицы были получены путем котрансфекции клеток HEK293Т. Экспрессия GFP и B7H3 была подтверждена проточной цитометрией (рис. 2). Окраска белка B7H3 выполнена антителом CD276 (BD, США).

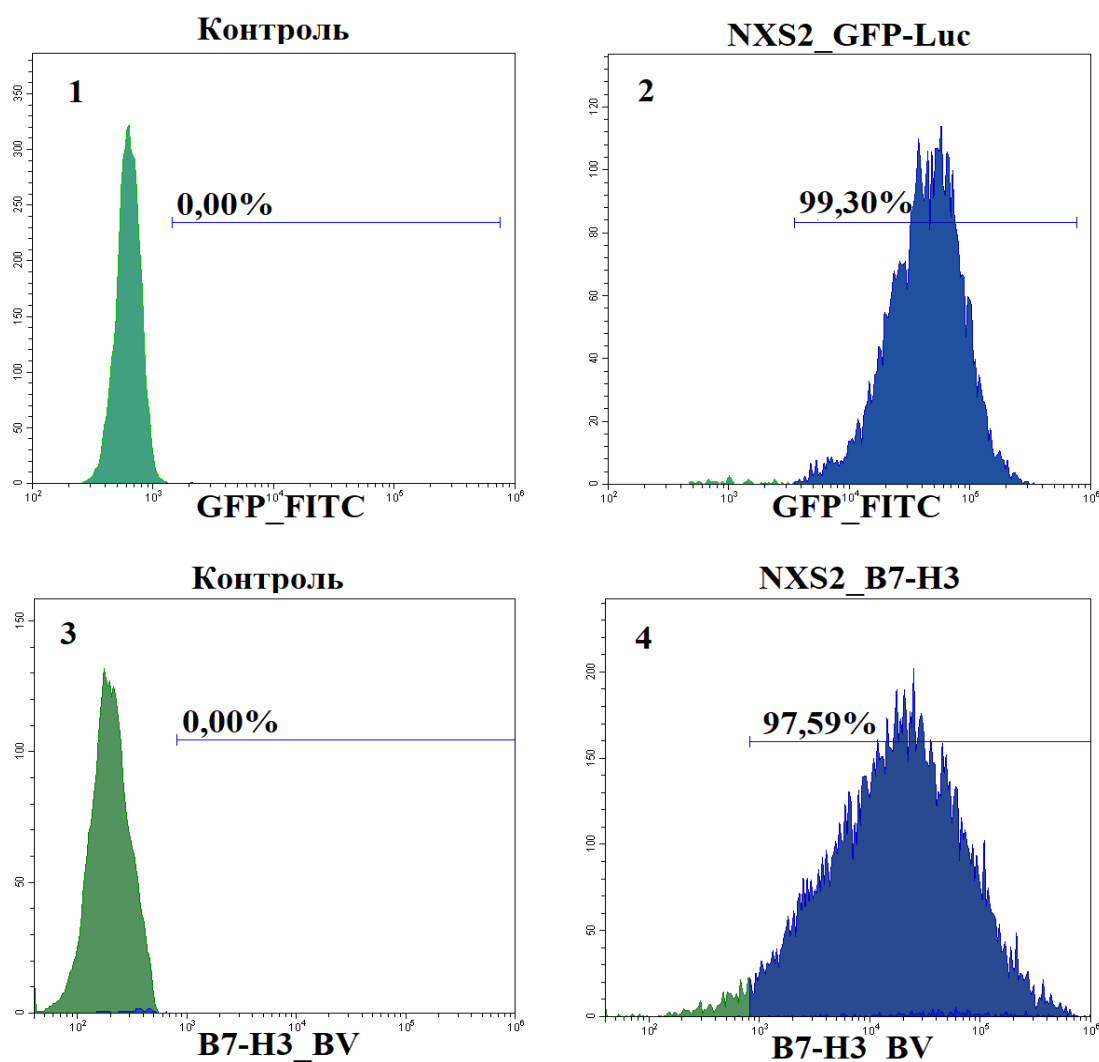


Рис. 2. Оценка уровня трансдукции клеточной линии NXS2. 1 и 3 – контроль (клетки NXS2 без трансдукции). 2 и 4 - трансдуцированные клетки

Приживление опухоли проводили однократно в область бедра путем подкожной инъекции клеточной суспензии в 100 мкл фосфатно-солевого буфера: группа 1 – NXS2_GFP-Luc в дозе $1,5 \times 10^6$ клеток ($n=8$), группа 2 – NXS2_GFP-Luc в дозе $2,0 \times 10^6$ клеток ($n=8$) и группа 3 – NXS2_B7H3 в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток ($n=8$). Контрольная группа без приживления опухоли составила 6 (3 самца и 3 самки) животных. Для оценки динамики роста раз в 5 дней измеряли объем опухоли (ширина $\times$ длина $\times$ ширина $\times \pi/6$) с помощью цифрового калипера, а также производили прижизненную съемку животных на визуализаторе IVIS (PerkinElmer, США) под ингаляционным наркозом (смесь изофлуран-кислород) через 15 мин после внутрибрюшинного введения люциферина.

На 10-е и 20-е сутки после введения клеточных суспензий для изучения морфологической характеристики привитой опухоли выполнен забор мягких тканей области инокуляции опухолевых клеток. На вскрытии проводили макроскопическую оценку опухоли (измерение диаметра первичного опухолевого узла и визуальный осмотр органов на наличие выраженных метастазов). Иссеченные опухолевые узлы и внутренние органы (печень, легкие) фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Далее фрагменты опухоли и органов подвергались гистологической проводке в вакуумном аппарате (Keede, Китай), а затем заливались в парафин. С парафиновых блоков с помощью ротационного микротомы CUT5062 (Slee Medical, Германия) готовили срезы толщиной 3 мкм и наносили их на предметные стекла с силанизированным адгезивным покрытием. После депарафинирования микропрепараты окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином для получения обзорной окраски. Полученные окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа Optec BK 5000 с фотокамерой и программным обеспечением. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism для Windows (GraphPad Software, La Jolla, США). Данные сравнивали критерием Манна-Уитни. Статистически значимыми различия принимали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Общее состояние и поведение животных на ранних сроках после имплантации суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 носили нормальный характер. Все животные были активны, подвижны, реагировали на раздражители, охотно поедали корм и потребляли воду. Статистически значимых различий по массе тела, потреблению пищи и воды не зафиксировано.

При введении $1,5 \times 10^6$ клеток на 9–10 сутки появились первые признаки развития опухолевого процесса с доступным для измерения первичным очагом, который изначально не пальпировался. При введении $2,0 \times 10^6$ клеток формирование опухоли начиналось на 1–3 дня раньше, т.е. на 7–9-е сутки. В данной группе отмечали наиболее выраженный рост первичного очага опухоли относительно других групп исследования (рис. 4).

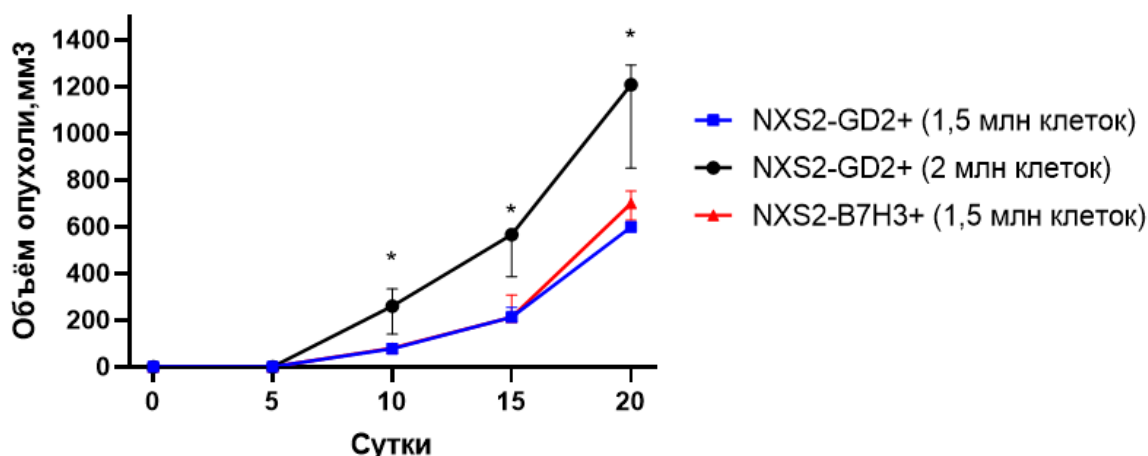


Рис. 4. Динамика роста опухоли у мышей A/J после имплантации опухолевых клеток NXS2, экспрессирующих GD2 и B7H3. Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей; * – $p < 0,05$ по сравнению с введением $1,5 \times 10^6$ клеток (критерий Манна-Уитни)

На 20-е сутки после инъекции суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 в

группе 1 опухоль не прижилась у 1 (12,5 %) мыши; в группе 2 – у 2 (25,0 %); в группе 3 – у 1 (12,5 %). После имплантации $1,5 \times 10^6$ клеток NX2, экспрессирующих как GD2, так и B7H3, динамика изменения объемов первичного очага опухоли была одинаковой, достоверных различий между данными группами не обнаружено.

Визуализация люминисценции первичного очага опухоли после имплантации опухолевых клеток NX2, экспрессирующих GD2, продемонстрирована на рис. 5.

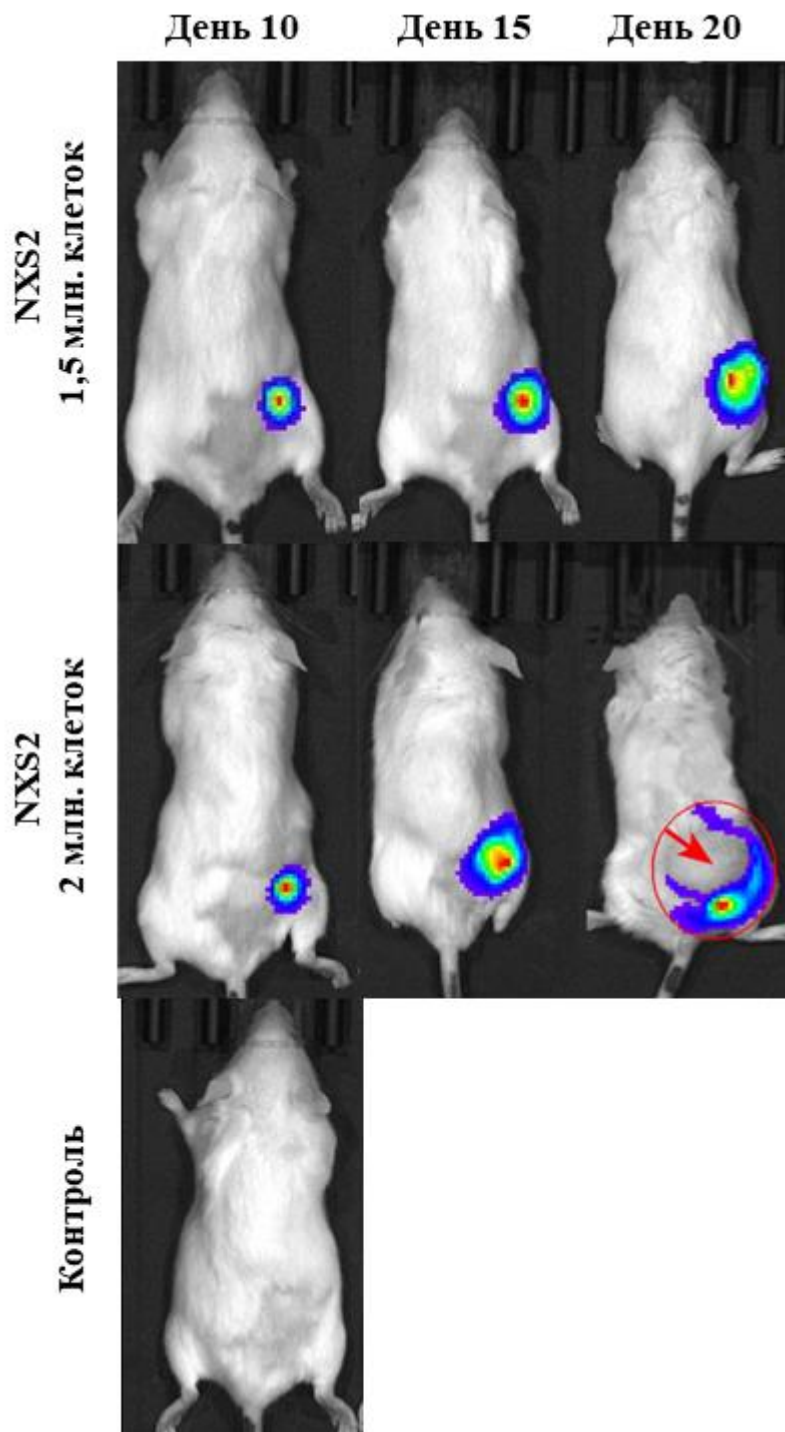


Рис. 5. Прижизненная детекция опухолевого очага по уровню интенсивности свечения люциферазы. Стрелкой указан очаг формирования некроза

Статистически достоверной разницы в размерах новообразования в зависимости от пола животного не установлено. После введения $2,0 \times 10^6$ клеток NX2 наблюдали наиболее интенсивную люминисценцию опухолевого очага, однако к 20 суткам эксперимента очаг опухоли частично утратил люминисценцию за счет формирования некроза. Таким образом, доза $2,0 \times 10^6$ клеток при

длительности эксперимента более 20 дней является избыточной, и целесообразно использовать дозу $1,5 \times 10^6$ клеток.

На 10-е и 20-е сутки после инъекции суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 в дозе $1,5 \times 10^6$ клеток в большинстве случаев ($n=6$; 75 %) при макроскопическом исследовании выявляли хорошо пальпируемое новообразование в зоне подкожной инъекции в правое бедро задней конечности. Опухолевый узел плотной консистенции, выраженной шарообразной формы, местами с темными участками некроза и/или кровоизлияния. Микроскопически солидный узел представлял собой бесструктурную ткань с плотной концентрацией клеток с признаками выраженной атипии и полиморфностью (рис. 6, А). Также наблюдали опухолевые клетки с фигурами митоза и клетки, в ядрах которых хроматин распределен диффузно в виде мелких зерен. Среди массы опухолевых клеток определялись тонкие фиброзные перегородки и многочисленные тонкостенные сосуды, площадь некроза незначительная – менее 5 % площади опухоли, воспалительная инфильтрация – скудная. Отмечался инвазивный рост опухолевых клеток в подлежащую мышечную ткань. После инъекции суспензии клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 в дозе $2,0 \times 10^6$ клеток сформированный опухолевый узел характеризовался обширными участками некроза, на долю которых приходилось более 50 % ткани (рис.6, Б).

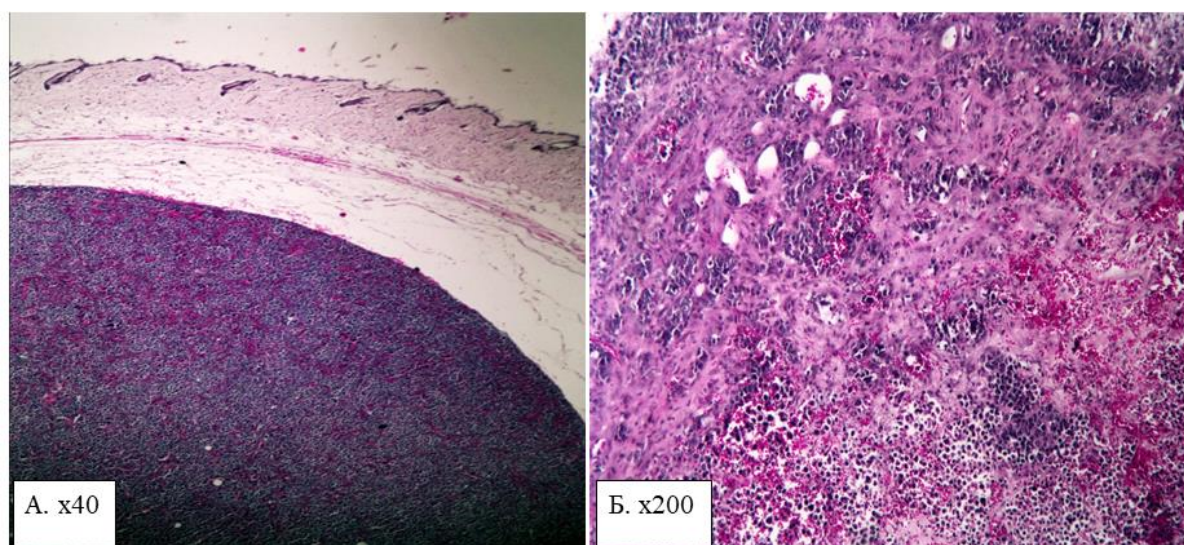


Рис. 6. Гистологическая картина сформированного опухолевого узла после подкожной имплантации клеток нейробластомы линии NXS2. Примечание: А – $1,5 \times 10^6$ клеток; Б – $2,0 \times 10^6$ клеток

Таким образом, характерными чертами нейробластомы NXS2 является узловый характер роста, опухоль сформирована гомогенной массой атипичных клеток с тонкими фиброзными волокнами и высокой степенью васкуляризации.

Экспрессия *B7H3* в опухоли, имплантированной мышам группы 3, проверена на 15-е сутки эксперимента методом проточной цитометрии (рис. 7).

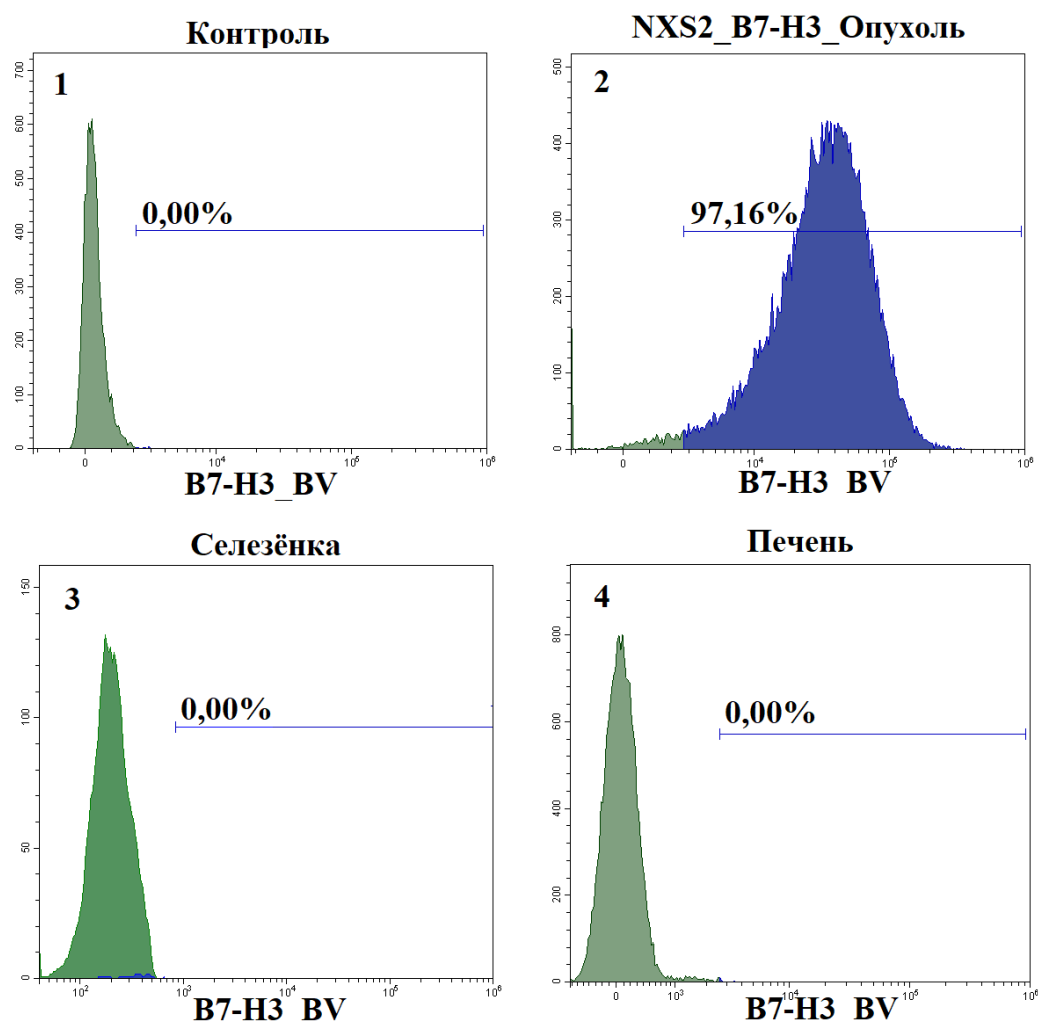


Рис. 7. Проверка экспрессии B7H3 в опухоли и органах мыши. 1 – отрицательный контроль; 2 – опухолевые клетки от мыши; 3 – печень мыши с привитой опухолью; 4 – селезенка мыши с привитой опухолью

Заключение. Была получена сингенная модель прививаемой опухоли нейробластомы NXS2. Трансгенные клеточные линии мышинной нейробластомы NXS2 с гетерологичной экспрессией *Luc* и *hB7H3* позволяют создать экспериментальную модель опухолевого процесса с оптимальной динамикой роста опухоли в течение более 20 дней после прививания опухоли. Полученная модель мышинной нейробластомы пригодна для экспериментального лечения, подразумевающего таргетирование мишеней GD2 и B7H3. По совокупности изученных морфологических параметров оптимальным периодом для проведения специального противоопухолевого лечения является 11–13 день с момента прививки злокачественных клеток.

Литература:

- [1] Bokova E.V., Tretyakova U.A., Shchegoleva M.S., Denisov A.A. In vivo model systems for research in oncology // *Advances in Molecular Oncology*. 2023. Vol. 10, № 2. P. 8–16.
- [2] Luksch R., Castellani M.R., Collini P. et al. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours) // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016. Vol. 107. P. 163–181.
- [3] van Heerden J., Abraham N., Schoeman J. et al. Reporting Incidences of Neuroblastoma in Various Resource Settings // *JCO Glob. Oncol*. 2021. №. 7. P. 947–964.
- [4] Shimada H. Tumors of the neuroblastoma group // *Pathology (Phila)*. 1993. Vol. 2. P. 43–59.
- [5] Anderson J., Majzner R. G., Sondel P.M. Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes // *Clin. Cancer Res*. 2022. Vol. 28. № 15. P. 3196–3206.
- [6] Kholodenko I.V., Kalinovskiy D.V., Doronin I.I. et al. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy // *J Immunol Res*. 2018. Vol. 2018. P. 7394268.
- [7] Neal Z.C., Yang J.C., Rakhmilevich, A.L. et al. Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy // *Clin. Cancer Res*. 2004. Vol. 10. № 14, P. 4839–4847.

D. V. LUTSKOVICH¹, A-M. V. EROFEEVA², M. A. KORNEEVA², H. V. KLYCH¹, S. V. MANKOVSKAYA²,
A. N. MELESHKO¹

SYNGENIC MODEL OF NEUROBLASTOMA

¹ State Institution "Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology, Immunology and Immunology", Borovlyany, Republic of Belarus

² State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus

Summary

The aim of the study was to establish a syngeneic model of neuroblastoma (NB) with the ability to target *GD2* and *B7H3*. Syngeneic mice of the A/J line (12 males and 12 females) were subcutaneously engrafted with transgenic *GD2*⁺ variants of the murine neuroblastoma cell line *NXS2* at a dose of 1.5 and 2 million cells, and 1.5 million *NXS2* cells transduced with human *hB7H3* protein gene. To evaluate the growth dynamics, tumor volume was measured every 5 days using a digital caliper, and vestibular imaging was performed on an IVIS imager, as well as histology of was assessed. To study the morphological characteristic of the grafted tumor, the animals were autopsied on the 10th and 20th days. The obtained murine neuroblastoma model is suitable for experimental treatment implying targeting of *GD2* and *B7H3* targets.

Key words: neuroblastoma, syngeneic model, lentiviral transduction.

УДК 57.085.23

О. Е. ПОЛУЛЯХ, Т. А. МИТЮКОВА, Е. Ф. ПОЛУКОШКО, Т. И. ТЕРПИНСКАЯ
**ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ АСТРОЦИТОВ В
МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ ВИРУСНОГО ГЕНЕЗА**

*Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии
наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Нейропсихические последствия вирусных инфекций могут быть связаны с активацией астроцитов, которая опосредована взаимодействием вирусного агента с толл-подобными рецепторами 3 типа (TLR3). Одним из наиболее часто используемых лигандов TLR3 является полиинозиновая:полицитидиловая кислота (Poly I:C), которая воспроизводит эффекты вирусного воздействия на клеточном уровне. Целью исследования было определение характера воздействия различных концентраций Poly I:C на выделение про- и противовоспалительных цитокинов, а также маркеров активации астроцитов – белка S100b и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в первичной культуре клеток астроглии крыс. Работа проводилась на первичной культуре астроцитов мозга новорожденных крыс. Моделирование воздействия вирусной инфекции осуществляли с использованием Poly I:C в интервале концентраций 6,25–100 мкг/мл. Определение цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10) и маркеров активации астроцитов S100b и GFAP в супернатантах культуры клеток проводили методом иммуноферментного анализа. Выявлено усиление синтеза провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β и ИЛ-6 в диапазоне доз Poly I:C 6,25–100 мкг/мл и 25–100 мкг/мл, соответственно. Показано синхронное повышение концентрации противовоспалительного ИЛ-10 при низких дозах лиганда, а также активация наработки астроглиальных белков S100b и GFAP при дозах Poly I:C 6,25–12,5 мкг/мл и подавление астроглиоза при нарастании концентрации лиганда TLR3. Таким образом, установлен дозозависимый характер эффектов влияния Poly I:C на культуру астроцитов.

Ключевые слова: астроциты, толл-подобные рецепторы 3 типа, астроглиальные белки, Poly I:C.

Введение. В настоящее время известно, что вирусные инфекции могут оказывать влияние на функциональное состояние мозга [1]. Установлены нейропсихиатрические последствия вирусных инфекций, такие как делирий, энцефалит, инсульт, нарушение обоняния и вкуса [1, 2]. Вирусные инфекции в период пренатального и раннего постнатального развития повышают риск возникновения шизофрении и аутизма [3]. На сегодняшний день патогенетические механизмы формирования нарушений функций мозга при вирусных инфекциях до конца не выяснены. Вирусы способны повреждать ЦНС как путем прямой инвазии, так и посредством активации иммунной системы [4]. Регуляция врожденного иммунного ответа в ЦНС зависит не только от микроглии, которая является основным компонентом иммунной защиты ЦНС, но и от астроцитов. В последнее время появляется все больше доказательств, указывающих на ряд изменений в структуре и функциях астроцитов, связанных с нейропсихическими заболеваниями: изменение морфологии клеток, экспрессии маркеров активации (глиального фибриллярного кислого белка, протеина S100b), а также опосредованной астроцитами синаптической пластичности [5]. При этом показано, что целый ряд вирусов, включая SARS-Cov-2, имеет тропизм к астроцитарным клеткам [6]. При попадании вируса в организм происходит его распознавание иммунными клетками посредством расположенных на них толл-подобных рецепторов (TLR). При этом происходит инициация внутриклеточного сигнального каскада, включающего ядерную транслокацию и активацию транскрипционных факторов (NF- κ B, AP1, IRF3, IRF7), которые опосредуют индукцию цитокинов [7].

Основными рецепторами, задействованными в противовирусной защите, являются внутриклеточные TLR3. Известно, что TLR3 экспрессируются не только иммунными клетками, но и рядом других клеток, в том числе астроцитами [8]. TLR3-опосредованная активация астроцитов способствует выработке как провоспалительных (TNF- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), так и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-11) [9]. Несмотря на то, что астроциты выполняют широкий спектр ключевых функций, информация о роли астроглиальных TLR3 в развитии заболеваний и травм ЦНС ограничена. Одним из наиболее часто используемых имитаторов вирусной инфекции является

полиинозиновая:полицитидиловая кислота (Poly I:C), представляющая собой синтетический аналог двухцепочечной РНК вируса. Poly I:C является лигандом TLR3 и вызывает иммунный ответ аналогично реальной вирусной инфекции [10].

Цель работы – определить характер воздействия различных концентраций Poly I:C на выделение про- и противовоспалительных цитокинов, а также маркеров активации астроцитов – белка S100b и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в первичной культуре клеток астроглии крыс.

Материалы и методы исследования. Получение первичной культуры астроцитов. Клетки нервной ткани выделяли из больших полушарий головного мозга новорожденных крысят Вистар согласно протоколу Ивановой А. Е. и др. [11]. Культивировали в чашках Петри с использованием среды DMEM/Ham's F-12 с L-глутамином и 15мМ HEPES (LT Biotech) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (10 %) и антибиотика/антимикотика (1 %) при температуре 37°C, содержании CO₂ – 5 %. Через 5 и 10 суток для удаления микроглии и олигодендроцитов проводили полную замену среды с предварительным встряхиванием на орбитальном шейкере (200 об/мин, 6 часов) в CO₂ инкубаторе. После достижения клеточным слоем 80–90 % конфлюэнтности астроциты высевали в 24-луночные планшеты (по 200 000 клеток в лунку), инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C в течение 2-х дней. Далее производили замену среды и переходили к этапу стимулирования клеток.

Моделирование воздействия вирусной инфекции. В лунки с культурой клеток вносили Poly I:C, в различных концентрациях: 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл. В контрольные лунки добавляли 0,9 % NaCl в соответствующем объеме. Инкубировали в течение суток, отбирали супернатант и замораживали при –80°C для дальнейших исследований.

Определение цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и астроцитарных белков S100b и GFAP в супернатантах культуры клеток проводили методом иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе ChemWell (США) с использованием коммерческих наборов Rat IL-6 (Interleukin-6) ELISA kit (Fine test, Китай), Rat IL-1 β (Interleukin 1Beta) ELISA kit (Fine test, Китай), Rat IL-10 (Interleukin-10), ELISA kit (Fine test, Китай), Rat S100b ELISA kit (Fine test, Китай), Rat GFAP ELISA (Fine test, Китай), соответственно.

Работа была проведена с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения Statistica 7.0. Использовали параметрические и непараметрические методы статистики. Сравнение между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни, достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-1 β поступательно повышалось, начиная с концентрации Poly I:C 6,25 мкг/мл и до 100 мкг/мл (рисунок 1).

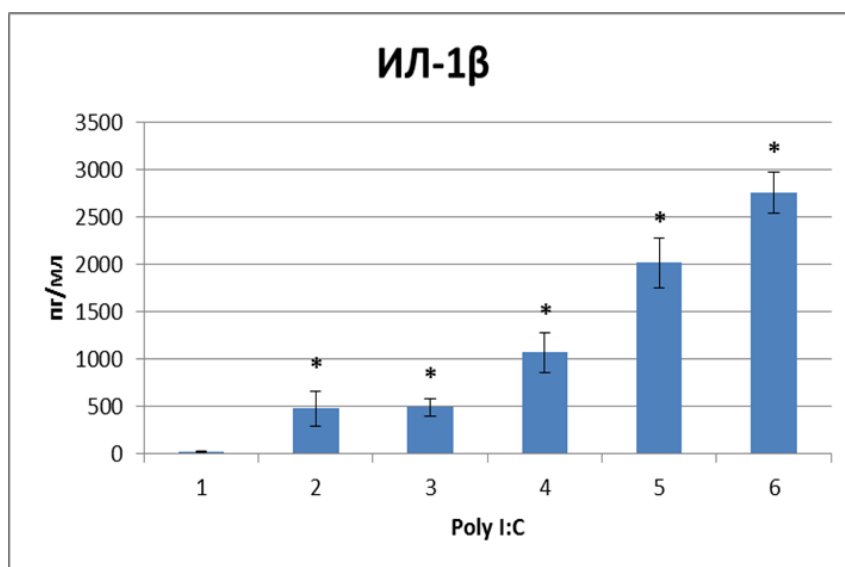


Рис. 1. Уровень ИЛ-1 β в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Стьюдента)

На рисунке 2 показано содержание ИЛ-6 в супернатантах культуры астроцитов при различных концентрациях Poly I:C. Значения ИЛ-6 при низких концентрациях Poly I:C не отличались от контроля. При стимуляции клеток в интервале концентраций Poly I:C от 25 мкг/мл до 100 мкг/мл содержание ИЛ-6 увеличивалось пропорционально дозе лиганда.

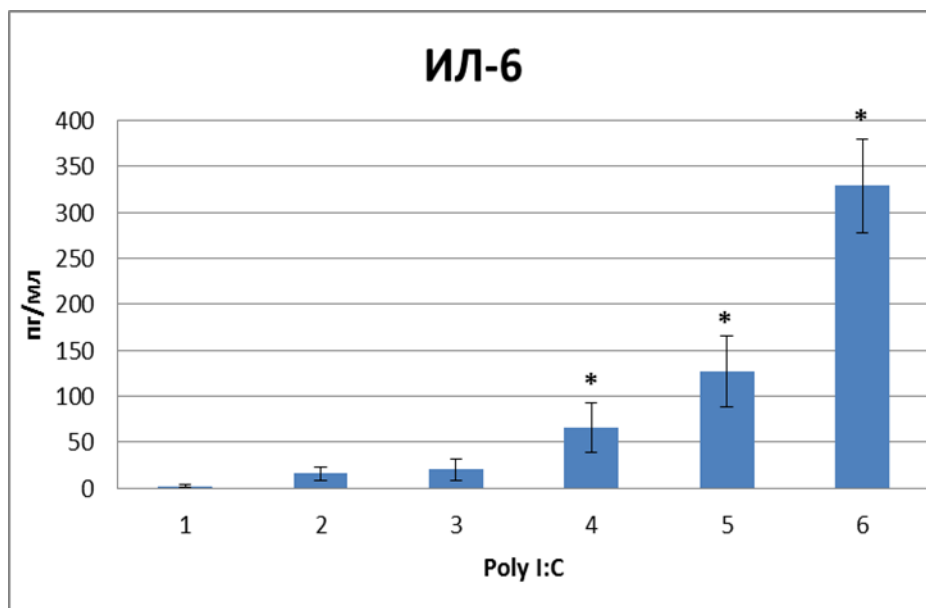


Рис. 2. Уровень ИЛ-6 в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Стьюдента)

Уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 поступательно повышался при концентрациях Poly I:C 6,25 и 12,5 мкг/мл и оставался на повышенном уровне по отношению к контролю (рисунок 3).

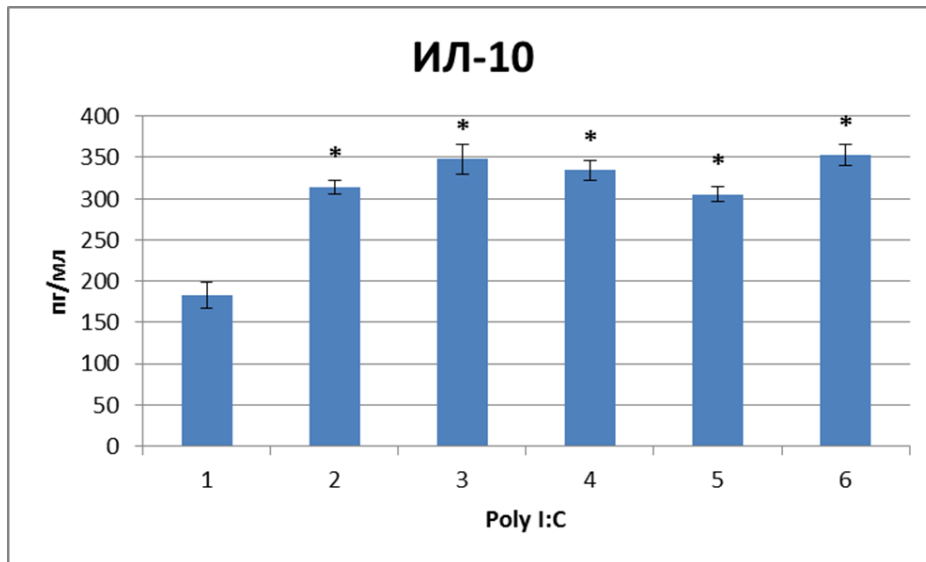


Рис. 3. Уровень ИЛ-10 в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Стьюдента)

При определении протеинов S100b и GFAP в супернатантах первичной культуры астроцитов установлено их статистически значимое одностороннее дозозависимое увеличение при стимуляции клеток Poly I:C в концентрациях 6,25 и 12,5 мкг/мл. При более высоких дозах Poly I:C концентрации S100b и GFAP резко снижались до минимальных значений, характерных для контроля – клеток без стимуляции (рисунок 4).

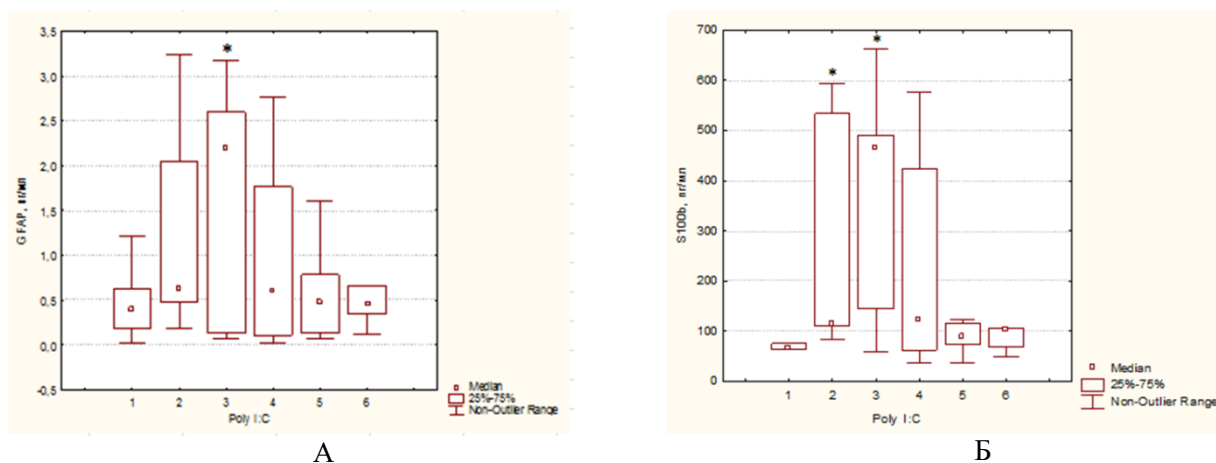


Рис. 4. Уровни GFAP (а) и S100b (б) в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни)

В литературе имеются данные об эффектах воздействия Poly I:C на TLR3 астроцитов мозга в различных экспериментальных условиях. В ряде работ показана индукция синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также усиление астроглиоза [12, 13, 14]. Так, в исследовании Park et al. установлено, что введение Poly I:C в культуру астроцитов человека вызывает повышение экспрессии генов воспалительных медиаторов (TNF- α , IFN- β и интерферон γ индуцибельного белка 10 (IP-10)) [12]. Авторы подтвердили свои результаты на мышинной модели в опытах *in vivo*, показав, что введение Poly I:C в стриатум мозга мыши вызывает активацию астроцитов и усиление воспалительных процессов в мозге [12]. В работах Scumpia et al. продемонстрировано, что введение Poly I:C в концентрациях 0,05–50 мкг/мл в первичную культуру астроцитов мозга крыс Sprague Dawley приводит к дозозависимому повышению экспрессии мРНК генов TNF- α и ИЛ-1 β , а также самих этих белков [13]. Deleidi et al. в экспериментах на крысах Sprague Dawley установили, что введение в черную субстанцию мозга Poly I:C в дозах 10, 20 и 40 мкг вызывает нейровоспалительный ответ, и приводит к повышению синтеза белка GFAP, а следовательно усилению астроглиоза [14].

В то же время в опытах на первичной культуре астроцитов, подвергнутых кислородно-глюкозной депривации, показан нейропротективный эффект Poly I:C. Pan et al. установили, что при кислородно-глюкозной депривации наблюдалось усиление воспалительных реакций за счет выброса TNF- α и IL-6, повреждение и гибель астроцитов. В то же время предварительная обработка Poly I:C значительно подавляла выработку провоспалительных цитокинов и повышала жизнеспособность клеток. Этот эффект был подтвержден в дальнейших исследованиях, проведенных на животных моделях ишемии мозга. Введение Poly I:C способствовало ослаблению неврологического дефицита, уменьшению объема инфаркта и снижению содержания TNF- α и IL-6 в ишемизированном стриатуме и коре головного мозга [15].

Полученные нами результаты демонстрируют, что, начиная с минимальных концентраций Poly I:C, отмечается статистически значимое повышение уровня ИЛ-1 β в среде инкубации астроцитов. При дальнейшем нарастании содержания лиганда наблюдалось поступательное увеличение выброса ИЛ-6. Рост уровней обоих провоспалительных цитокинов продолжался вплоть до высоких доз лиганда TLR3 – 100 мкг/мл. Нами показано, что активация синтеза противовоспалительного ИЛ-10 отмечалась, начиная с минимальных концентраций Poly I:C, и это совпадало с динамикой выброса ИЛ-1 β . Можно предположить, что повышение концентрации противовоспалительного медиатора ИЛ-10 носило компенсаторный характер.

Многочисленные исследования подтверждают, что воздействие Poly I:C вызывает астроглиоз, который проявляется не только нарастанием синтеза про- и противовоспалительных интерлейкинов, но также повышением наработки астроглиальных белков – GFAP и S100b [16, 17]. В наших экспериментах выявлено нарастание концентраций GFAP и S100b при дозах Poly I:C 6,25–12,5 мкг/мл в среде инкубации астроцитов. При более высоких концентрациях Poly I:C (12,5–100 мкг/мл), напротив, происходит подавление астроглиоза, что проявляется снижением уровней этих белков.

Заключение. В результате проведенных исследований установлены особенности дозозависимых эффектов влияния Poly I:C на изученные показатели в культуре астроцитов. При

определении уровней провоспалительных цитокинов выявлено поступательное усиление синтеза ИЛ-1 β , начиная с минимальных концентраций лиганда TLR3 6,25 мкг/мл и вплоть до 100 мкг/мл, а также нарастание синтеза ИЛ-6 в интервале концентраций 25–100 мкг/мл. Изучение характера сдвигов противовоспалительного цитокина ИЛ-10 показало его статистически значимое повышение в интервале доз Poly I:C от 6,25 мкг/мл до 100 мкг/мл по сравнению с контролем. Активация наработки астроглиальных белков GFAP и S100b начиналась при концентрации Poly I:C 6,25 мкг/мл и достигала своего пика при дозе лиганда 12,5 мкг/мл. При дальнейшем повышении концентрации Poly I:C в среде уровни белков возвращались к контрольным значениям.

Литература:

- [1] Pol A. Viral infection leading to brain dysfunction: more prevalent than appreciated? // *Neuron*. 2009. Vol. 64, № 1. P. 17–20.
- [2] Glezer I. et al. Viral infection and smell loss: The case of COVID-19 // *J Neurochem*. 2021. Vol. 157, № 4. P. 930–943.
- [3] Meyer U. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? // *Pediatric research*. 2011. Vol. 69. P. 26–33.
- [4] Griffin D. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS // *Nature reviews immunology*. 2003. Vol. 3. P. 493–502.
- [5] Kim R. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: from astrocytopathy to astrogliosis // *Prog neuropsychopharmacol boil psychiatry*. 2018. Vol. 87, Part A. P. 126–146.
- [6] Andrews M. et al. Tropism of SARS-CoV-2 for developing human cortical astrocytes // *Proc natl acad sci USA*. 2022. Vol. 119, № 30.
- [7] Zhong B. Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription // *Virology*. 2006. Vol. 352, № 1. P. 14–21.
- [8] Carpentier P. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli // *Glia*. 2005. Vol. 49, № 3. P. 360–374.
- [9] Guerrero-Garcia J. The role of astrocytes in multiple sclerosis pathogenesis // *Neurologia*. 2020. Vol. 35, № 6. P. 400–408.
- [10] Fortier M-E. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004. Vol. 287, № 4. P. 759–766.
- [11] Иванова А. Е. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функции астроцитов // *Биологические мембраны*. 2013. Т. 30, № 5–6. С. 387–397.
- [12] Park Ch. TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression // *Glia*. 2006. Vol. 53, № 3. P. 248–256.
- [13] Scumpia Ph. Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes // *Glia*. 2005. Vol. 52, № 2. P. 153–162.
- [14] Deleidi M. The toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid triggers nigrostriatal dopaminergic degeneration // *The Journal of Neuroscience*. 2010. Vol. 30, № 48. P. 16091–16101.
- [15] Pan L. Toll-like receptor 3 agonist Poly I:C protects against simulated cerebral ischemia in vitro and in vivo // *Acta pharmacologica sinica*. 2012. Vol. 33. P. 1246–1253.
- [16] Mafuika S. N. The potential of serum S100 calcium-binding protein B and glial fibrillary acidic protein as biomarkers for traumatic brain injury // *Translational Research in Anatomy*. 2022. Vol. 29. P. 1–8.
- [17] Michetti F. The S100b story: from biomarker to active factor in neural injury // *Journal of neurochemistry*. 2019. Vol. 148. P. 168–187.

O. Y. POLULIAKH, T. A. MITYUKOVA, Y. F. POLUKOSHKO, T. I. TERPINSKAYA

INDICATORS OF THE FUNCTIONAL STATE OF ASTROCYTES IN THE MODEL OF INFLAMMATION OF VIRAL GENESIS

*State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus*

Summary

The neuropsychiatric consequences of viral infections may be associated with astrocyte activation that is mediated by the interaction of the viral agent with toll-like receptor type 3 (TLR3). One of the most commonly used TLR3 ligands is polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C), which reproduces the effects of viral exposure at the cellular level. The aim of the study was to determine the nature of the effect of different concentrations of Poly I:C on the release of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as markers of astrocyte activation – S100b protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in primary culture of rat

astroglia cells. The work was carried out on primary culture of brain astrocytes of newborn rats. Modeling of viral infection exposure was carried out using Poly I:C in the concentration range of 6.25–100 µg/ml. Cytokines (IL-1β, IL-6, IL-10) and astrocyte activation markers S100b and GFAP in cell culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Increased synthesis of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-6 was detected in the Poly I:C dose range of 6.25–100 µg/mL and 25–100 µg/mL, respectively. A synchronous increase in the concentration of anti-inflammatory IL10 at low doses of ligand, as well as activation of astroglial protein S100b and GFAP production at Poly I:C doses of 6.25–12.5 µg/mL and suppression of astrogliosis with increasing ligand TLR3 concentration were shown. Thus, the dose-dependent nature of Poly I:C effects on astrocyte culture has been established.

Keywords: astrocytes, toll-like receptor type 3, astroglial proteins, Poly I:C.

Ю. Н. ВОРОНИК, А. В. КИТУРКО

СТРУКТУРНЫЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ И ТОЩЕЙ КИШОК У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХОЛЕСТАЗА МАТЕРИ

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь*

В тонкой кишке животных, рождённых от самок с экспериментальным холестазом беременных, наблюдались морфо- и цитометрические изменения, особенно выраженные в её слизистой оболочке. Было установлено достоверное снижение общей толщины стенки двенадцатиперстной и тощей кишок, высоты ворсин, глубины крипт, высоты микроворсинчатого эпителия слизистой оболочки, площади и периметра его ядер. В эпителиоцитах ворсинок двенадцатиперстной и тощей кишок достоверно уменьшалась активность СДГ, НАДН-ДГ и возрастала ЛДГ; в эпителиоцитах крипт достоверно возрастала активность ЛДГ, СДГ уменьшалась лишь в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки, достоверных изменений НАДН-ДГ не установлено.

Ключевые слова: холестаз, беременность, двенадцатиперстная кишка, тощая кишка, потомство, крысы.

Введение. Физиологическая беременность – нормальное явление для женщин репродуктивного возраста, при этом она оказывает колоссальную нагрузку на организм и может спровоцировать возникновение патологических процессов в желчевыводящей системе [9]. Известно, что во время беременности увеличивается нагрузка на печень, что истощает ее резервные возможности, возрастает влияние прогестерона на тонус и моторику желчевыводящих путей, что способствует возникновению желчнокаменной болезни и холестаза. [6]. Клинические симптомы холестаза и биохимические изменения в крови женщин нормализуются через некоторое время после родов, при этом выявлено, что данная патология может весьма негативно отразиться на течении беременности: отмечаются преждевременные роды [7, 14, 24], повышается частота кровотечений в третьем триместре беременности и в раннем послеродовом периоде, чаще, чем у здоровых женщин, наблюдается многоводие [8, 16]. Рядом проведённых исследований установлено, что экспериментальный холестаз, смоделированный у беременных крыс, приводит к удлинению сроков беременности, рождению потомства с признаками нарушения физического развития [1], вызывает нарушение развития пищеварительной, половой [10, 12, 13], выделительной [7, 10], иммунной [2, 11] и нервной [5] систем. Также наблюдается угнетение функций щитовидной железы, сопровождаемое морфологическими изменениями в ней [3].

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 20-ти животных 2-х суточного возраста с соблюдением требований, изложенных в Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными. Группу «холестаз» составили 10 крыс, полученных от матерей с экспериментально смоделированным на 17-е сутки беременности подпечёчным обтурационным холестазом [7], в группу «контроль» входили 10 крыс, рождённых от самок, которым в тот же срок беременности производили лишь лапаротомию. Все самки исследуемых групп и родившиеся от них потомство содержались в одинаковых условиях вивария со свободным доступом к пище и воде [4, 5]. При постановке эксперимента в соответствии с Хельсинской Декларацией соблюдались правила гуманного обращения с животными.

Животных исследуемых групп, достигших 2-х суточного возраста, выводили из опыта лёгким эфирным наркозом с последующей декапитацией. Сразу после тщательного осмотра у них забирали фрагмент начальной части двенадцатиперстной и средней части тощей кишок. Кусочки взятого материала после фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин по принципу «контроль-холестаз». Изготовленные парафиновые срезы толщиной 5 мкм, после окраски гематоксилином и эозином, использовали для гистологических и морфометрических исследований. На парафиновых

срезах толщиной 10 мкм определяли в клетках содержание и локализацию гликопротеинов (ГП) по Шабдашу, сиаломуцинов (СМ) по Spicer (альциановый синий, при pH 2,5), рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону [22]. Другие кусочки двенадцатиперстной и тощей кишок подвергали глубокому замораживанию в жидком азоте с последующим монтированием по этому же принципу на объектодержатели в криостате фирмы Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) при температуре -15°C. В криостатных срезах толщиной 10 мкм определяли в эпителиоцитах слизистой оболочки локализацию и активность дегидрогеназ: сукцината (СДГ; сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1; по Нахласу и др., 1957); лактата (ЛДГ; L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс и др. 1958), и восстановленного НАДН (НАДН·ДГ; акцептор-оксидоредуктаза: КФ 1.6.93.3 по Нахласу и др. 1958). Все гистохимические реакции сопровождались бессубстратными контролями [4, 15].

Изучение гистологических и гистохимических препаратов, с последующим морфо- и цитометрическим анализом, изготовление иллюстрационного материала осуществляли с использованием микроскопа Axioskop 2 plus (Германия), оснащённого цифровой камерой Leica DFC 320 (Германия). Для морфо- и цитометрической обработки использовали программу Image Warp (Bit Flow, USA). На гистологических препаратах животных групп «контроль» и «холестаз» исследовали следующие морфометрические показатели: толщину стенки, высоту и ширину ворсин, глубину крипт, общую толщину мышечной оболочки, её наружного и внутреннего слоёв. В микроворсинчатых эпителиоцитах ворсинок и крипт измеряли высоту, толщину щёточной каёмки, площадь и периметр ядер. Размеры структур выражали в микрометрах (мкм). Содержание РНП, активность ферментов – в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.), содержание гликопротеинов, сиаломуцинов оценивали визуально. Полученные цифровые данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows. При обработке данных использовали двусторонний непарный U-критерий Манна-Уитни. Данные в таблице представлены в виде Me (Q25;Q75), где Me – медиана, а Q25 – нижний и Q75 – верхний квартиль. Результаты считались достоверными при значениях $p < 0,05$ [4, 15].

Результаты и их обсуждение. В результате исследования выявлено, что холестаз, смоделированный беременным самкам крыс, задерживал развитие структур двенадцатиперстной и тощей кишок 2-х суточного потомства, рожденного в таких условиях. Отмечалось уменьшение общей толщины стенки органа (двенадцатиперстной кишки на 12,07 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 16,63 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем), снижение высоты ворсинок (двенадцатиперстной кишки на 10,06 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 13,33 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем) и глубины крипт (двенадцатиперстной кишки на 25,29 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 31,39 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем) (таблица 1).

Табл. 1. Морфометрические показатели двенадцатиперстной и тощей кишок экспериментальных 2-суточных крыс, Me (Q25;Q75)

Показатели (мкм)	Двенадцатиперстная кишка		Тощая кишка	
	«контроль»	«холестаз»	«контроль»	«холестаз»
Общая толщина стенки	360,11 (307,34;381,82)	316,63 (310,29;365,73)*	335,86 (311,23;365,26)	280,01 (258,18;295,49)*
Высота ворсинок	217,90 (154,09;248,41)	195,98 (153,04;203,06)*	208,26 (202,08;230,64)	180,49 (157,56;196,54)*
Ширина ворсинок	61,60 (46,98;81,88)	58,74 (43,78;63,55)	52,24 (47,68;54,30)	46,78 (45,27;52,62)
Высота эпителиоцитов ворсинок	13,18 (12,43;13,78)	11,35 (11,09;11,56)*	12,57 (12,24;12,77)	11,35 (10,80;12,38)*
Толщина щёточной каёмки эпителиоцитов ворсинок	1,17 (0,91;1,32)	0,83 (0,69; 0,96)	1,13 (0,93;1,22)	0,88 (0,68;0,94)
Площадь ядер эпителиоцитов ворсинок, мкм ²	19,88 (18,92;20,40)	15,31 (13,92;16,42)*	22,73 (22,24;23,24)	14,46 (14,04;14,75)*
Периметр ядер эпителиоцитов ворсинок	17,66 (17,42;17,97)	15,22 (14,56;15,89)*	18,76 (18,19;18,92)	14,95 (14,80;15,08)*
Глубина крипт	34,40 (30,77;42,19)	25,70 (18,43;35,06)*	28,48 (22,91;32,63)	19,54 (19,03;20,73)*
Высота эпителиоцитов крипт	10,13 (9,75;11,35)	7,79 (7,46;8,60)*	10,73 (9,49;11,31)	8,62 (8,50;9,20)*

Продолжение таблицы 1

Площадь ядер эпителиоцитов крипт, мкм ²	16,83 (15,82;18,65)	13,49 (9,84;12,10)*	18,85 (18,58;19,13)	13,08 (12,66;15,78)*
Периметр ядер эпителиоцитов крипт	16,06 (15,61;16,88)	13,50 (12,24;13,72)*	17,42 (17,14;17,92)	14,65 (14,52;15,61)*
Общая толщина мышечной оболочки	34,02 (28,67;49,09)	28,36 (26,61;40,16)	27,48 (24,76;31,04)	20,53 (19,47;24,18)
Толщина внутреннего слоя мышечной оболочки	23,72 (16,44;35,76)	14,24 (12,87;20,99)	18,51 (15,49;19,97)	13,44 (11,81;16,87)
Толщина наружного слоя мышечной оболочки	12,19 (10,97;16,85)	10,55 (7,10;11,55)	8,50 (6,79;9,14)	6,38 (6,21;6,54)

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении групп «контроль» и «холестаз»

Микроворсинчатые эпителиальные клетки ворсинок двенадцатиперстной и тощей кишок крыс в группе «холестаз» по сравнению с группой «контроль» характеризовались меньшей высотой (двенадцатиперстной кишки на 13,88 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 9,71 % ($p < 0,05$)). Щеточная каёмка, расположенная на апикальной поверхности эпителиоцитов, имела вид тонкой яркой оксифильной полоски и проявляла тенденцию к уменьшению толщины по сравнению с контролем (таблица 1). Микроворсинчатые эпителиальные клетки, покрывающие ворсинки двенадцатиперстной и тощей кишок, имели призматическую форму, их цитоплазма отличалась однородной мелкой зернистой оксифильной окраской. В эпителиальных клетках, расположенных преимущественно в области верхней трети ворсинок, часто наблюдалось явление вакуолизации цитоплазмы. Ядра эпителиоцитов имели округлую форму, окрашивались базофильно, располагались рыхло. Мелкодисперстный хроматин равномерно распределен в кариоплазме. Ядрышки имели центральное положение. Ядра микроворсинчатых эпителиоцитов ворсинок по сравнению с контролем имели меньшую площадь (двенадцатиперстной кишки на 22,99 % ($p < 0,05$), тощая кишка на 36,38 % ($p < 0,05$)) и периметр (двенадцатиперстная кишка на 13,82 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 20,31 % ($p < 0,05$)) (таблица 1, рисунок 1).

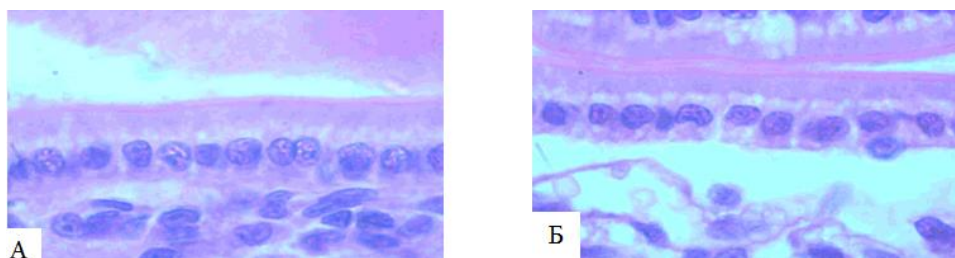


Рис. 1. Структурные особенности эпителиоцитов ворсинок тощей кишки 2-суточных крыс групп «контроль» (А) и «холестаз» (Б), окраска гематоксилином и эозином, ув. 1000

Строма некоторых ворсинок часто отечная, гемокапилляры сильно расширены (рисунок 2).

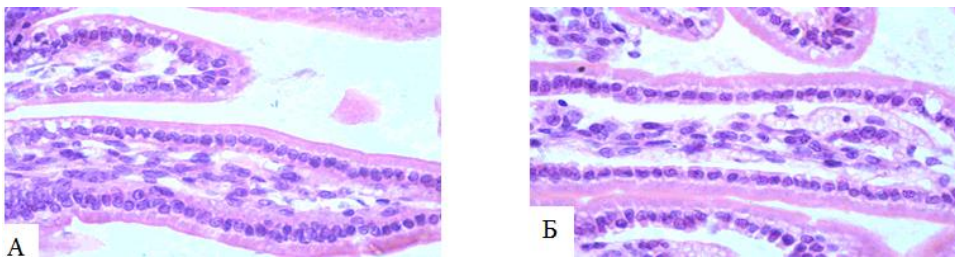


Рис. 2. Ворсинки тощей кишки 2-суточных крыс групп «контроль» (А) и «холестаз» (Б), окраска гематоксилином и эозином, ув. 400

Крипты у 2-х суточных крыс группы «холестаз» имели вид хаотично расположенных небольших углублений. Высота микроворсинчатых эпителиальных клеток, выстилающих крипты, ниже, чем в контрольной группе (двенадцатиперстной кишки на 23,10 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 19,66 % ($p < 0,05$)). Щеточная кайма в эпителиальных клетках крипт практически не просматривалась. Ядра округлой формы, плотно прилегали друг к другу, их площадь (двенадцатиперстной кишки на 19,85 % ($p < 0,05$), тощей кишки на 30,61 % ($p < 0,05$)) и периметр (двенадцатиперстной кишки на 15,94 % ($p < 0,05$)), тощей кишки на 15,90 % ($p < 0,05$)) уменьшилась по сравнению с контролем

(таблица 1, рисунок 3). В области дна крипт визуализировались клетки Панета. Бокаловидные и митотически делящиеся клетки встречались визуально реже по сравнению с контролем.

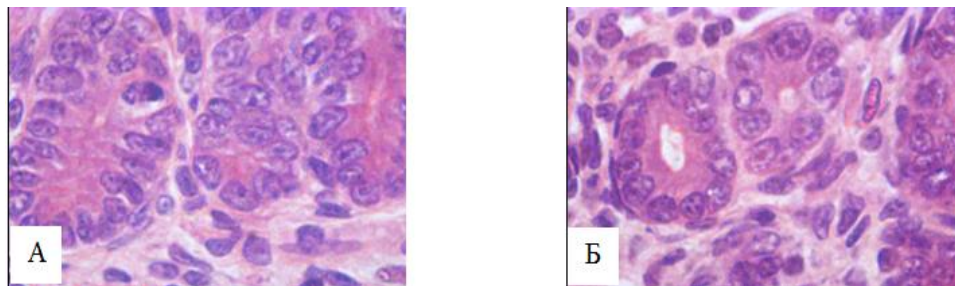
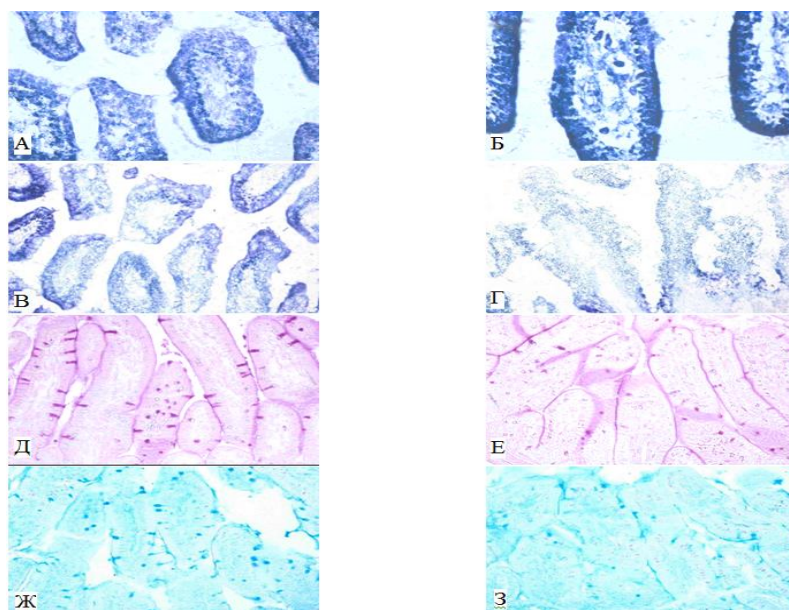


Рис. 3. Эпителиоциты крипт двенадцатиперстной кишки 2-суточных крыс групп «контроль» (А) и «холестаз» (Б), окраска гематоксилином и эозином, ув. 1000

Значимых изменений морфометрических показателей мышечной оболочки двенадцатиперстной и тощей кишок у 2-х суточных крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери, не выявлено (таблица 1).

Активность ферментов в цитоплазме микроворсинчатых эпителиальных клеток крыс группы «холестаз» изменялась неоднозначно: в эпителиальных клетках ворсинок двенадцатиперстной и тощей кишок значительно снижалась активность СДГ и НАДН·ДГ и повышалась ЛДГ; в эпителиальных клетках крипт достоверно повышалась активность ЛДГ, СДГ снижалась только в эпителиальных клетках двенадцатиперстной кишки, значимых изменений НАДН·ДГ не установлено (таблица 2, рисунок 4).



А, Б – локализация и активность ЛДГ в эпителиоцитах ворсинок тощей кишки, окраска по Гесс, Скарпелли, Пирсу, ув. 400; В, Г – локализация и активность СДГ в эпителиоцитах ворсинок двенадцатиперстной кишки, окраска по Нахласу др., ув. 200; Д, Е – содержание гликопротеинов тощей кишке, окраска по Шабадашу, ув. 200; Ж, З – содержание сиаломуцинов в двенадцатиперстной кишке, окраска по Spicer, ув. 200

Рис. 4. Цитохимические особенности слизистой оболочки двенадцатиперстной и тощей кишок 2-суточных крыс экспериментальных групп: «контроль» (А, В, Д, Ж) и «холестаз» (Б, Г, Е, З)

Продукты реакции укрупнялись, полярность расположения не всегда сохранялась (рисунок 4). Содержание РНП в эпителиальных клетках ворсинок и крипт двенадцатиперстной и тощей кишок животных из группы «холестаз» существенно не менялось (таблица 2).

Табл. 2. Активность ферментов и содержание РНП в эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной и тощей кишок 2-суточных животных экспериментальных групп, Ме (Q25;Q75)

Показатели (ед.опт.пл.)	Двенадцатиперстная кишка		Тощая кишка	
	«контроль»	«холестаз»	«контроль»	«холестаз»
СДГ, ворсинки	0,36 (0,33;0,36)	0,25 (0,17;0,33)*	0,39 (0,35;0,43)	0,26 (0,23;0,29)*
СДГ, крипты	0,21 (0,17;0,25)	0,14 (0,12;0,15)*	0,25 (0,15;0,36)	0,18 (0,15;0,27)

Продолжение таблицы 2

НАДН·ДГ, ворсинки	0,33 (0,29;0,34)	0,20 (0,18;0,21)*	0,43 (0,39;0,49)	0,23 (0,21;0,28)*
НАДН·ДГ, крипты	0,17 (0,14;0,18)	0,12 (0,12;0,14)	0,25 (0,18;0,28)	0,15 (0,07;0,20)
ЛДГ, ворсинки	0,28 (0,21;0,33)	0,39 (0,37;0,43)*	0,36 (0,34;0,44)	0,48 (0,42;0,53)*
ЛДГ, крипты	0,21 (0,17;0,24)	0,3 (0,26;0,32)*	0,27 (0,24;0,31)	0,47 (0,41;0,56)*
РНК, ворсинки	0,10 (0,09;0,12)	0,18 (0,12;0,25)	0,10 (0,07;0,12)	0,12 (0,10;0,14)
РНК, крипты	0,36 (0,30; 0,37)	0,36 (0,28;0,64)	0,34 (0,31;0,38)	0,35 (0,29;0,43)

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении групп «контроль» и «холестаз»

Содержание гликопротеинов и сиаломуцинов в структурах двенадцатиперстной и тощей кишок у экспериментальных животных группы «холестаз» визуально уменьшалось по сравнению с контролем; преимущественно это наблюдалось в бокаловидных клетках и концевых отделах подслизистых желез двенадцатиперстной кишки, где эти полимеры обнаруживались в виде следов. Также эти биополимеры были выявлены в тонком слое слизи, преимущественно покрывающем нижнюю треть ворсинок (рисунок 4).

В результате эксперимента установлено, что моделирование обтурационного подпеченочного холестаза у самок крыс на 17-е сутки беременности приводит к развитию морфологических и цитохимических изменений в структурах двенадцатиперстной и тощей кишок у их 2-х суточного потомства. Механизм патологического влияния холестаза беременности на потомство сложен и до конца не установлен. На основании данных литературы можно предположить, что ведущую роль в возникновении выявленных изменений играет токсическое действие желчных кислот, уровень которых значительно возрастает при этой патологии в сыворотке крови беременной [19, 21, 23], а также выявляется в пуповинной крови [17]. Желчные кислоты, попадая в организм плода, вызывают увеличение содержания активных форм кислорода, оказывают повреждающее действие на развивающиеся органы и могут вызывать долговременные изменения, которые проявляются вплоть до взрослого возраста [18, 20].

В данном исследовании отмечено значительное уменьшение общей толщины стенки двенадцатиперстной и тощей кишок, высоты ворсинок, глубины крипт, высоты микроворсинчатого эпителия слизистой оболочки, площади и периметра его ядер. Установлены цитохимические изменения в цитоплазме микроворсинчатых эпителиальных клеток. Выявленные изменения, вероятно, в дальнейшем могут вызывать структурные и функциональные нарушения в тонкой кишке крыс, что впоследствии окажет крайне негативное влияние на общее состояние организма.

Заключение. На основании полученных результатов, можно сделать заключение, что у потомства 2-х суточных крыс, полученного от самок с обтурационным холестазом смоделированным на 17-е сутки беременности, выявлялись морфологические и цитохимические изменения в структурах двенадцатиперстной и тощей кишок, преимущественно выраженные в микроворсинчатом эпителии. Полученные результаты подтверждают данные о весьма негативном влиянии вышеуказанной патологии на состояние здоровья потомства, развивавшегося в таких условиях.

Литература:

- [1] Брюхин Г.В. Показатели физиологической зрелости потомства в условиях хронических холестатических поражений печени матери // Морфология. 1995. Т. 108, № 1. С.35–38.
- [2] Брюхин Г.В., Михайлова Г. И., Пашина Е. Н. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменений селезёнки потомства самок крысы с экспериментальным хроническим поражением печени различной этиологии // Морфология. 2005. Т. 127, № 3. С. 48–51.
- [3] Брюхин Г.В., Николина О.В., Барышева С.В. Морфофункциональная характеристика щитовидной железы потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различной этиологии // Морфология. 2005. Т. 128, № 5. С. 56–59.
- [4] Вороник Ю.Н., Мацюк Я.Р. Морфометрическая и цитохимическая характеристика двенадцатиперстной кишки крыс, рождённых от самок, употреблявших этанол во время беременности // Вопросы наркологии. 2018. Т. 163, № 3. С. 86–94.
- [5] Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Нарушения морфогенеза коры мозжечка потомства крыс с экспериментальным холестазом и их коррекция // Вести Национальной академии наук Беларуси. 2015. № 3. С. 95–101.
- [6] Кахраманова В.Ф., Торчинов А.М., Кузнецов В.П. Морфофункциональное состояние печени при гестозе // Ж. акушерства и гинекологии. 2007. № 1. С. 3–5.
- [7] Кизюкевич Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе. Гродно, 2005. 239 с.
- [8] Ключаева А.А., Вавилова Л.В. Внутрпечёночный холестаз беременных // Здравоохранение. 2007. № 3. С. 72–73.

- [9] Кушнарёва Н.С. Регуляция экскреторной функции печени крысы при холестазах: роль пролактина: Автореф. дис. кан. биол. наук: Инст. цит. и ген. СО РАН, 2009. 25 с.
- [10] Мацюк Я.Р. и др. Морфологические свойства органов пищеварительной и мочеполовой систем 45-суточных крысят, родившихся от самок с экспериментальным холестазом // Журн. ГрГМУ. 2005. № 2. С. 31–35.
- [11] Мацюк Я.Р. и др. Показатели неспецифической клеточной и гуморальной резистентности, компонентов прооксидантно-антиоксидантного равновесия у потомства крыс, родившегося в условиях холестаза, экспериментально вызванного в период фетогенеза // Журн. ГрГМУ. 2007. № 2. С. 29–31.
- [12] Мацюк Я.Р., Михальчук Е. Ч. Мацюк, Я. Р. Особенности структурных и цитохимических свойств собственных желез желудка 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза, экспериментально вызванного в период фетогенеза // Журн. ГрГМУ. 2007. № 2. С. 46–49.
- [13] Можейко Л.А. Использование урсофалька для коррекции структурно-функциональных нарушений экзокринной части поджелудочной железы потомства, вызванных экспериментальным холестазом беременных самок // Журнал ГрГМУ. 2009. № 1. С. 53–55.
- [14] Омобоогундже Э.Ч. Гормонально-биохимические взаимоотношения у беременных с внутрипечёночным холестазом // Biomed. et bios. anthropology. 2009. № 13. С. 212–216.
- [15] Чернышев Ю.Н. Морфофункциональный анализ тощей кишки крысят, развивавшихся в условиях холестаза матери // Журнал ГрГМУ. 2014. № 3. С. 33–37.
- [16] Dang A. et al. Prevalence of liver disease in pregnancy et its outcome with emphasis on obstetric cholestasis : An Indian scenario // J Obstet Gynaecol India. 2010. Vol. 60, № 5. P. 413–418.
- [17] Geenes V., Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy // World J Gastroenterol. 2009 Vol. 15, № 17. P. 2049–2066.
- [18] Han F. et al. Magnesium sulphate can alleviate oxidative stress and reduce inflammatory cytokines in rat placenta of intrahepatic cholestasis of pregnancy model // Archives of Gynecology and Obstetrics. 2018. Vol. 298, № 3. P. 631–638.
- [19] Larson S.P., Kovilam O., Agrawal D.K. Immunological Basis in the Pathogenesis of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy // Expert Rev Clin Immunol. 2016 Vol. 12, № 1. P. 39–48.
- [20] Papacleovoulou G. et al. Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring // J Clin Invest. 2013 Vol. 123, № 7. P. 3172–3181.
- [21] Perino A. et al. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging // Physiological Reviews. 2021 Vol. 101, № 2. P. 683–731.
- [22] Pirs Je. Gistohimija teoreticheska i prikladnaja. M.: IL, 1962. 962 s.
- [23] Smith D.D., Rood K.M. Intrahepatic cholestasis of pregnancy // Clinical Obstetrics & Gynecology. 2020 Vol. 63, № 1. P. 134–151.
- [24] Wood A.M. et al. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy: A Review of Diagnosis and Management // Obstet Gynecol Surv. 2018 Vol. 73, № 2. P. 103–109.

Y. N. VORONIK, A. V. KITURKO

STRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL PARAMETERS OF THE DUODENUM AND JEJUNUM IN NEWBORN RATS DEVELOPED UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL MATERNAL CHOLESTASIS

Educational Institution "Grodno State Medical University", Grodno, Republic of Belarus

Summary

In the small intestine of animals born from females with experimental cholestasis of pregnancy, morpho- and cytophotometric changes were observed, especially pronounced in its mucous membrane. A significant decrease in the total thickness of the wall of the duodenum and jejunum, the height of the villi, the depth of the crypts, the height of the microvillous epithelium of the mucous membrane, the area and perimeter of its nuclei was established. In the epithelial cells of the villi of the duodenum and jejunum, the activity of SDH and NADH.DH significantly decreased and LDH increased; in crypt epithelial cells, LDH activity significantly increased, SDH decreased only in duodenal epithelial cells, no significant changes in NADH.DH were detected.

Key words: cholestasis, pregnancy, duodenum, jejunum, offspring, rats.

УДК 616.34-008.87:616.853+616-092.9

Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ, А. А. ЖАБИНСКАЯ, А. В. ЧУПРИНА,
В. В. СОЛТАНОВ

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* И *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* НА РАЗВИТИЕ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Проведено сравнительное исследование эффектов длительного применения монопробиотиков *Bifidobacterium longum* BL-05 и *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 в условиях пентилентетразолового киндлинга. Показано, что развитие модели пентилентетразолового киндлинга наряду с ожидаемым градуальным ростом показателей судорожной активности приводит к характерным изменениям в поведении животных – отсутствию угасания активности в открытом поле со временем, а также к нейродеструкции в СА1 области дорсальной части гиппокампа. Применение *L. rhamnosus* несколько изменяет баланс частоты и интенсивности судорожной активности в модели, однако в целом незначительно влияет на её развитие. *B. longum*, напротив, интенсифицируют нарастание судорог в модели и приводят к росту числа животных с полным её развитием. Вместе с тем, оба пробиотика показывают нейропротекторный эффект, выражающийся в сохранении нейрональной плотности в СА1-области гиппокампа. Полученные результаты указывают на неоднозначность эффектов пробиотиков в условиях пентилентетразолового эпилептогенеза и на необходимость использования различных моделей для всесторонней оценки эффектов применения пробиотиков для коррекции патогенеза эпилепсии.

Ключевые слова: пробиотики, лактобациллы, бифидобактерии, эпилепсия, пентилентетразол, гиппокамп, открытое поле.

Введение. Накапливающиеся клинические и экспериментальные данные указывают на то, что кишечная микробиота играет важнейшую роль в функционировании не только терминальной части пищеварительного тракта, но и регуляторных систем организма [1]. Фундаментальные вопросы функционирования оси «микробиота-кишечник-мозг» в настоящее время являются одними из актуальнейших в современной научной дискуссии [2]. Установлено, что развитие нервных патологий характеризуется изменением состава кишечной микробиоты [3–5]. И наоборот, микробный дисбиоз может отягощать течение таких патологий. В связи с этим, все чаще предлагается использовать методы модификации состава кишечной микробиоты для коррекции патогенеза неврологических заболеваний и усиления методов их лечения [6]. В особенности актуален вопрос в случае эпилепсии, так как для неё характерна распространённость фармакорезистентных, в том числе неоперабельных форм, в особенности у детей [7]. Встречаемость таких форм в целом остается постоянной – около 30 % от общего числа пациентов. Предполагается, что кишечная микробиота может влиять на работу мозга в норме и в условиях эпилептогенеза через различные механизмы. В частности, микробы кишечника могут взаимодействовать с лимфоидной тканью, афферентами висцеральных нервов, выделять в кровоток собственные метаболиты, к которым за годы эволюции у макроорганизма выработаны специфические и неспецифические рецепторы (FFARs, PPARs) [2].

В экспериментальных и клинических исследованиях эффективности нутритивной модификации кишечной микробиоты при эпилепсии часто используют смеси большого количества пробиотических бактерий различных групп и пребиотических нутриентов [8]. В данном контексте для понимания механизмов формирования эффектов пробиотикотерапии представляется актуальной оценка применения монопробиотиков из различных групп микроорганизмов. Разнообразие моделей эпилепсии позволяет с разных сторон исследовать возможные точки влияния экспериментальных методов коррекции эпилептогенеза и эффективность нутритивных методов модификации кишечной микробиоты. Одна из наиболее часто используемых моделей – пентилентетразоловый киндлинг. Под киндлингом понимают феномен увеличения вероятности и интенсивности судорожного приступа у первоначально здорового организма при длительном введении через равные промежутки времени

подпороговых доз конвульсанта (химический киндлинг) или применения подпороговой силы электрической стимуляции (электрический киндлинг). Моделирование эпилептогенеза путем пентилентетразолового киндлинга у грызунов удобно тем, что позволяет в долгосрочной перспективе проследить динамику развития индуцированных конвульсантом судорог, а также оценить изменения в поведении и гистопатологические изменения в целевых областях головного мозга в условиях экспериментального воздействия с потенциальным позитивным эффектом [9]. Принципиальной особенностью данной модели является нарастающее в её течении повреждающее воздействие конвульсанта, которое с одной стороны позволяет на начальных этапах модели оценить эффекты экспериментального воздействия в более мягких условиях, а на заключительных этапах, когда большинство лабораторных животных развило киндлинг – произвести оценку этих же эффектов в более жёстких условиях [10].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей эпилептогенеза в модели пентилентетразолового киндлинга в условиях длительного применения монопробиотиков *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus rhamnosus*.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на самцах крыс Вистар в возрасте P28-35 с первоначальной массой 50–60 г. Эксперименты проведены с соблюдением принципов биоэтики и согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986, в редакции 2005 года). Дизайн исследования, объем выборок и использованная экспериментальная модель эпилепсии одобрены комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси.

В качестве пробиотической добавки использовали лиофилизированные бактерии *Bifidobacterium longum* BL-05 или *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 (CustomProbiotics, США). Порошок суспендировали в 1 мл натрий-фосфатного буфера (PBS; pH 7,4; 0,01 M) и вводили ежедневно внутрижелудочно с помощью металлического зонда в количестве 10^9 КОЕ на крысу. Каждое животное получало 1 мл соответствующей суспензии или чистого PBS ежедневно независимо от возраста и массы тела. В течение первых двух недель животные получали только пробиотики или PBS. Далее моделировали эпилептогенез в течение еще 8 недель. Таким образом, было сформировано 4 группы: 1. Здоровый контроль (PBS внутрижелудочно, без модели, n=8); 2. Крысы, получавшие PBS в условиях PTZ-киндинга (PTZ, n=12); 3. Крысы, получавшие *B. longum* в условиях PTZ-киндинга (PTZ+*B. longum*, n=12); 4. Крысы, получавшие *L. rhamnosus* в условиях PTZ-киндинга (PTZ+ *L. rhamnosus*, n=12).

Инъекции пентилентетразола (Sigma, США) в соответствующих экспериментальных группах производили внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг три раза в неделю (понедельник, среда, пятница). Для корректировки индивидуальной дозы животных этих групп дополнительно взвешивали перед каждым введением конвульсанта. PTZ растворяли в 0,9 % растворе NaCl в концентрации 15 мг/мл. Перед введением PTZ животных рассаживали в индивидуальные прозрачные клетки размером 20x14x16 см. После инъекции в течение 30 минут проводили одновременную видеорегистрацию поведения 18 животных. Далее эксперимент повторяли для следующей партии из 18 животных. Животных разных групп распределяли по двум партиям одинаково.

Впоследствии по видеозаписи проводили оценку судорожной активности по бальной шкале Расина [11]: 0 – отсутствие судорог; 1 – клонусы лицевых мышц; 2 – усиление лицевых клонусов с переходом на шею и/или миоклоническое вздрагивание; 3 – клонические сокращения обеих передних конечностей без подъема на задние лапы; 4 – клонус передних конечностей с подъемом на задние лапы; 5 – падение на бок с клоническими судорогами передних и/или задних лап и генерализацией приступа; 6 – падение на бок с клоническими судорогами конечностей, переходящими в тонические судороги, или эпистатус, или смерть. Кроме того, после каждого введения оценивали суммарное количество и длительность приступов и период времени до появления судорог, в том числе интенсивных – 4 балла и более. Животное считали развившим киндлинг после трехкратного подряд повторения 5 или 6 баллов по шкале Расина, а также при достижении эпистатуса длительностью более 15 минут. В таком случае инъекции прекращали, а показатели такого животного оставляли до конца эксперимента неизменными в соответствии с последними зарегистрированными.

Тест «открытое поле» проводили перед началом киндинга, а также через 4 и 8 недель после его начала. Для этого крыс помещали в центр круглой арены диаметром 1,2 м и в течение 3 минут регистрировали их поведение: количество вертикальных стоек на задних лапах, пройденных центральных и периферических секторов, актов груминга и выходов в центр.

Через 2 дня после 24-го введения PTZ животных декапитировали, головной мозг быстро извлекали из черепа, разделяли на полушария и помещали на сутки в 10 %-й раствор формалина. Далее готовили парафиновые фронтальные (левое полушарие) и горизонтальные (правое полушарие) срезы толщиной 5 мкм, окрашивали их тионином по Ниссли и определяли нейрональную плотность в дорсальном и вентральном гиппокампе (область CA1 и хилус) в программе ImageJ.

Статистическую обработку и визуализацию данных осуществляли в программах Statistica 10 и GraphPad Prism 8. Для межгруппового сравнения морфометрических показателей использовали критерий Краскела-Уоллиса, попарные сравнения проводили с помощью критерия Манна-Уитни (данные представлены в виде медианы и квартилей (М (25 %;75 %)). В случае оценки судорожной активности и изменений в поведении использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями с апостериорным критерием Фишера (данные представлены в виде средней арифметической и её ошибки ($M \pm m$)). Частоту развития полного киндлинга сравнивали по результатам точного критерия Фишера. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. В ходе анализа судорожной активности крыс в условиях пентилентетразолового киндлинга наиболее информативными показателями оказались количество судорог, максимальный зарегистрированный балл и период времени до наступления судорог в 4 и более баллов (рисунок 1). Развитие модели приводило к градуальному росту показателей судорожной активности (рисунок 1, А-В): количество судорог после последнего введения конвульсанта составило $12,3 \pm 2,3$, а максимальный зарегистрированный балл – $3,6 \pm 0,2$. При применении обоих пробиотиков с момента появления первых судорог (4-е введение) отмечалась тенденция к более низкому значению количества судорог (рисунок 1, А), однако достоверно ниже показатель был в обеих группах только после 20 и 21 введения – в среднем на 25–42 %.

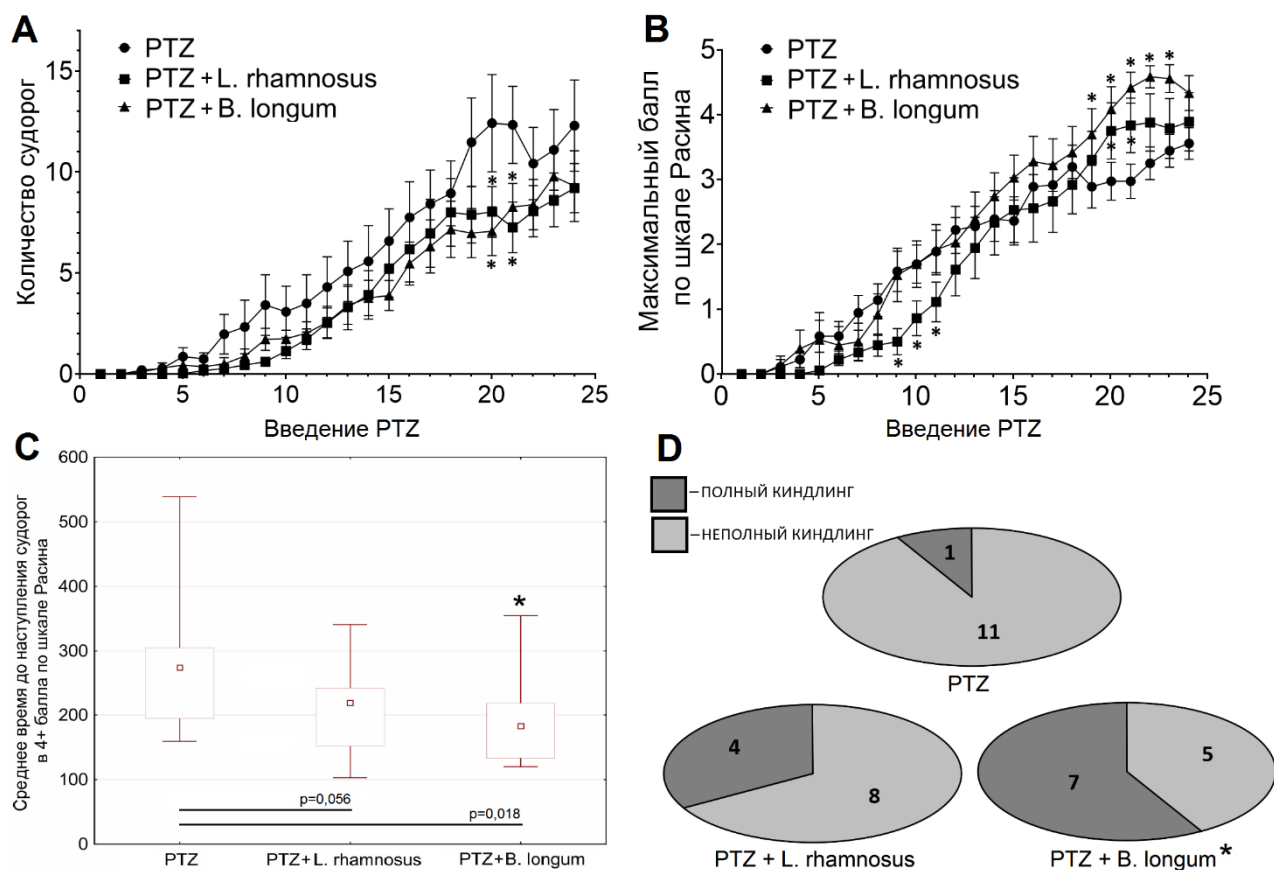


Рис. 1. Показатели развития пентилентетразолового киндлинга у крыс различных экспериментальных групп

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем в группе PTZ

В случае максимального балла для *L. rhamnosus* отмечалось более низкое значение показателя – 9 по 11 введение конвульсанта – в среднем в 1,5–3 раза по сравнению с группой PTZ (рисунок 1, В). Вместе с тем, после 20 и 21 введения показатель, напротив, был выше группы отрицательного

контроля в среднем на 10–28 %. Применение бифидобактерий приводило к изменению показателя несколько иначе – в начале киндлинга отличий от группы PTZ не отмечалось, а с 19 по 23 введение показатель был достоверно выше группы отрицательного контроля в среднем на 27–48 %. Таким образом, отмеченное выше уменьшение количества судорог происходило, видимо, в связи с увеличением их интенсивности, в особенности в случае применения бифидобактерий. Анализ времени до наступления интенсивных судорог (4 балла и более) показал, что применение бифидобактерий приводило к его сокращению по медианным значениям на 34 %, тогда как для лактобацилл подобный эффект оставался недостоверным (рисунок 1, С). Наконец, статистический анализ частоты полного развития модели киндлинга (рисунок 1, D) показал, что в случае применения бифидобактерий доля крыс, трижды подряд развивавших 5–6 стадии лимбических судорог, значительно повышалась.

Таким образом, применение бифидобактерий *B. longum* несколько снижает количество судорог на завершающем этапе киндлинга, однако при этом отмечается одновременное повышение интенсивности судорог, уменьшение латентного периода перед их появлением, а также растет число животных, развивающих модель полностью. В аналогичных условиях лактобациллы *L. rhamnosus* на начальном этапе киндлинга снижают частоту судорог, однако на завершающем – на короткий период увеличивают их интенсивность. Вместе с тем, в отличие от бифидобактерий, здесь не происходит значимого сокращения латентного периода перед наступлением судорог и увеличения числа животных, развивших модель полностью.

Результаты анализа наиболее репрезентативных показателей в тесте «Открытое поле» представлены на рисунке 2.

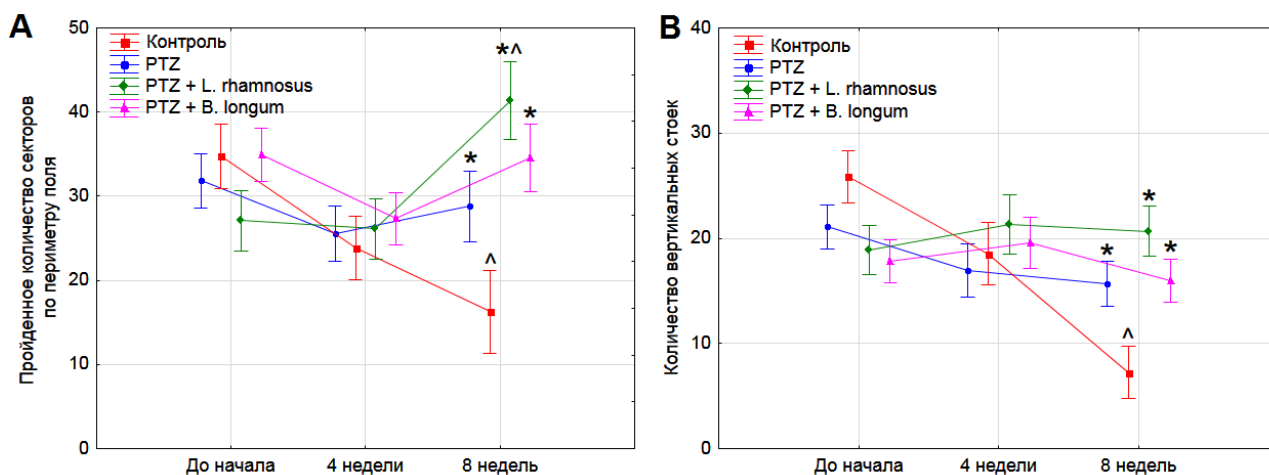


Рис. 2. Динамика изменения поведения при повторном проведении теста «Открытое поле» у крыс различных экспериментальных групп

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем в группе PTZ; ^ – $p < 0,05$ по сравнению с первоначальными значениями для группы

Повторное прохождение теста через 4 и 8 недель от начала эксперимента у здоровых животных приводит к постепенному уменьшению горизонтальной (рисунок 2, А) и вертикальной (рисунок 2, В) двигательной активности. В первом случае показатель уменьшается к концу эксперимента в среднем более, чем в 2 раза, во втором – почти в 4 раза. Подобный феномен, по-видимому, вызван привыканием животных к открытому полю, как к уже знакомому пространству, что было показано нами ранее при других сроках эксперимента [12]. В то же время, установлено, что развитие модели пентилентетразолового эпилептогенеза приводит к тому, что животные сохраняют двигательную и исследовательскую активность в открытом поле в течение всего эксперимента: не наблюдается характерного для здоровых животных снижения активности со временем, а показатели в заключительном тесте в среднем в 2 раза превышают показатели контрольной группы. В аналогичных условиях применение *B. longum* значимо не сказывается на этой картине. С другой стороны, применение *L. rhamnosus* приводит к несколько более активной локомоции на завершающем этапе исследования – по сравнению с первоначальными значениями животные передвигались в этой группе на 53 % больше. Тем не менее, достоверных отличий от группы PTZ здесь не наблюдалось. Таким образом, развитие PTZ-киндинга приводит к нарушениям в двигательной и исследовательской активности крыс в открытом поле, выражающимся в отсутствии угасания интереса к нему.

Применение пробиотиков существенно не сказывается на этом негативном следствии развития модели, однако при потреблении лактобацилл всё же, в противоположность здоровым животным, несколько увеличивается локомоторная активность в последующих тестах.

Анализ гистоструктуры гиппокампа показал, что развитие модели пентилентетразолового киндинга сказывается только на нейрональной плотности в области CA1 дорсального гиппокампа (рисунок 3). У здоровых животных слой *stratum pyramidale* области CA1 гиппокампа был представлен компактными слоями (как правило 4–6) плотно расположенных нейронов. Нейроны имели пирамидальную форму со светлой цитоплазмой и крупным ядром, в котором хорошо визуализировалось ядрышко, реже два (рисунок 3, А).

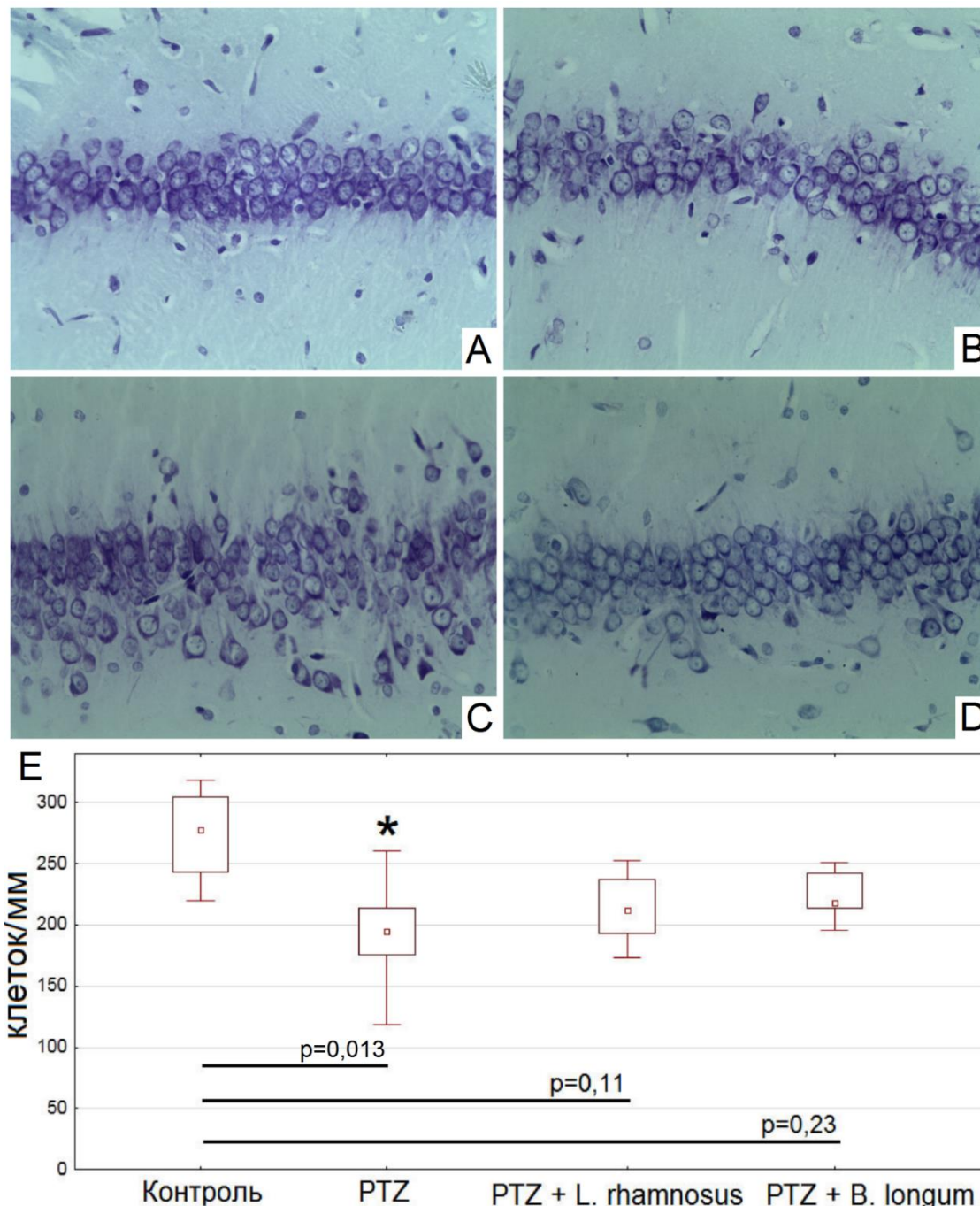


Рис. 3. Особенности гистоструктуры CA1 области гиппокампа крыс различных экспериментальных групп. А – контроль; В – PTZ; С – PTZ+*L. rhamnosus*; D – PTZ+*B. longum*. Окраска по Нисслю, увеличение x400. Е – Нейронная плотность в CA1 области гиппокампа крыс

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем в группе PTZ

При гистологическом исследовании в зоне CA1 пирамидного слоя гиппокампа крыс после моделирования эпилептогенеза (рисунок 3, В) часто выявлялось незначительное клеточное

опустошение, которое характеризовалось менее плотным, чем в контрольной группе, прилеганием нейронов пирамидного слоя друг к другу. Здесь также чаще встречались гиперхромные нейроны.

Морфометрический анализ подтвердил, что нейрональная плотность в зоне CA1 дорсального гиппокампа в условиях развития модели эпилептогенеза снижалась: в группе контроля показатель составил 278 (245;308) клеток на мм, тогда как в группе PTZ – 194 (179;218) клеток на мм. Несмотря на видимую тенденцию к снижению в обеих группах крыс, получавших при моделировании эпилептогенеза пробиотики, достоверных отличий от значений здоровых животных не отмечено.

Таким образом, можно утверждать, что развитие модели эпилептогенеза приводит к значимой нейродеструкции в области CA1 дорсальной части гиппокампа, при этом применение пробиотиков оказывает весьма умеренный, однако значимый нейропротекторный эффект, несколько снижая количество погибших нейронов.

Полученные результаты указывают на то, что применение пробиотиков может негативно сказываться на патогенезе эпилепсии, по крайней мере, определенных её форм. С одной стороны, для использованной в работе модели пентилентетразолового киндлинга в некоторых работах показано, что применение комплексных пробиотических препаратов или синбиотиков оказывает позитивный эффект, уменьшая интенсивность или частоту индуцированных судорог или подавляя негативные биохимические процессы, вызванные ими [13–16]. Однако в случае применения монопробиотиков часто выраженные эффекты отсутствуют [17]. Более того, в работе J.Y. Еог и соавт. применение монопробиотика *Lactobacillus fermentum* в условиях моделирования пентилентетразолового киндлинга приводило к увеличению количества судорог [18]. Среди наших результатов наибольшее внимание на себя обращают усиление судорожной активности при применении *B. longum*. Ранее нами было показано выраженное нейропротекторное и противовоспалительное действие данного пробиотика в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии [19]. В настоящей работе также был показан умеренный нейропротекторный эффект в модели киндлинга. Таким образом, по-видимому, основным эффектом пробиотика является его влияние на сохранность нейронов отделов височной доли в условиях повторяющихся судорог. При этом обнаруженное нами усиление киндлинга может быть вызвано, в частности, влиянием пробиотика на биохимические пути утилизации пентилентетразола. Кроме того, особенность модели киндлинга предполагает периодическое повторное введение конвульсанта до конца эксперимента, что может существенно влиять на пути реализации позитивных эффектов пробиотиков как во всем организме, так и в головном мозге. В любом случае, полученные нами результаты указывают на необходимость более тщательного подбора пробиотических микроорганизмов, исследования их эффектов на фоне применения стандартных методов лечения неврологических заболеваний в целом и эпилепсии в частности, а также на целесообразность использования нескольких моделей патологий для более полного понимания возможных эффектов пробиотиков и раскрытия механизмов таких эффектов.

Заключение. Таким образом, развитие модели пентилентетразолового киндлинга наряду с ростом показателей судорожной активности приводит к изменениям в поведении животных – сохранению активности в открытом поле со временем, а также к нейродеструкции в CA1 области дорсальной части гиппокампа. Применение пробиотических бактерий *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 несколько уменьшает частоту, но увеличивает интенсивности судорожной активности в модели, однако в целом слабо влияет на её развитие. Вместе с тем, применение в аналогичных условиях *Bifidobacterium longum* BL-05 приводит к интенсификации судорожной активности, уменьшению задержки перед первыми судорогами и увеличивает частоту полного развития модели. При этом и *L. rhamnosus*, и *B. longum* оказывают умеренный нейропротекторный эффект в CA1 области гиппокампа. Полученные результаты указывают на необходимость использования различных моделей эпилепсии для оценки эффектов пробиотиков в рамках развивающейся концепции «микробиота-кишечник-мозг».

Литература:

- [1] Adak A., Khan M.R. An insight into gut microbiota and its functionalities // Cell Mol Life Sci. 2019. Vol. 76. P. 473–493.
- [2] Zubareva O., Melik-Kasumov T. The Gut–Brain Axis and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in the Regulation of Epileptogenesis // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2021. Vol. 57. P.743–760.
- [3] Xu Q. et al. Causal Relationship Between Gut Microbiota and Autoimmune Diseases: A Two-Sample Mendelian Randomization Study // Front Immunol. 2021. Vol. 12. P. 746998.
- [4] Grabrucker S. et al. Microbiota from Alzheimer’s patients induce deficits in cognition and hippocampal neurogenesis // Brain. 2023. Vol. 146. P. 4916–4934.

- [5] Petrov V.A. et al. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease // Bull Exp Biol Med. 2017. Vol. 162. P.734–737.
- [6] Zhou C. et al. Changes and significance of gut microbiota in children with focal epilepsy before and after treatment // Front Cell Infect Microbiol. 2022. Vol. 12. P. 965471.
- [7] Katayayan A., Diaz-Medina G. Epilepsy: Epileptic Syndromes and Treatment // Neurol Clin. 2021. Vol. 39. P. 779–795.
- [8] Gómez-Eguílaz M., Ramón-Trapero J.L., Pérez-Martínez L., Blanco J.R. The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study // Benef Microbes. 2018. Vol. 9. P.875–881.
- [9] Singh T., Mishra A., Goel R.K. PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability // Metab Brain Dis. 2021. Vol. 36. P.1573–1590.
- [10] Samokhina E., Samokhin A. Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model // Int J Neurosci. 2018. Vol. 128. P. 1086–1096.
- [11] Lüttjohann A., Fabene P.F., van Luijcklaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats // Physiol Behav. 2009. Vol. 98. P. 579–586.
- [12] Melik-Kasumov T., Korneeva M., Chuprina A., Zhabinskaya A., Rozhko A. Neuroprotective Effect of Palmitoylethanolamide in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2022. Vol. 58. P. 448–456.
- [13] Bagheri S., Heydari A., Alinaghipour A., Salami M. Effect of probiotic supplementation on seizure activity and cognitive performance in PTZ-induced chemical kindling // Epilepsy Behav. 2019. Vol. 95. P. 43–50.
- [14] Aygun H., Akin A.T., Kızılaslan N., Sumbul O., Karabulut D. Electrophysiological, histopathological, and biochemical evaluation of the protective effect of probiotic supplementation against pentylenetetrazole-induced seizures in rats // Eur J Neurol. 2023. Vol. 30. P. 3540–3450.
- [15] Kilinc E., Ankarali S., Ayhan D., Ankarali H., Torun I.E., Cetinkaya A. Protective effects of long-term probiotic mixture supplementation against pentylenetetrazole-induced seizures, inflammation and oxidative stress in rats // J Nutr Biochem. 2021. Vol. 98. P. 108830.
- [16] Tahmasebi S., Oryan S., Mohajerani H.R., Akbari N., Palizvan M.R. Probiotics and Nigella sativa extract supplementation improved behavioral and electrophysiological effects of PTZ-induced chemical kindling in rats // Epilepsy Behav. 2020. Vol. 104. P.106897.
- [17] Sabouri S., Kangi S., Najimi S., Rahimi H.-R. Effects of probiotics on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice // Epilepsy Res. 2021. Vol. 176. P. 106723.
- [18] Eor J.Y., Son Y.J., Kim J.-Y., Kang H.-C., Youn S.E., Kim J.H., Kim S.H. Neuroprotective effect of both synbiotics and ketogenic diet in a pentylenetetrazol-induced acute seizure murine model // Epilepsy Res. 2021. Vol. 174. P. 106668.
- [19] Zubareva O.E., Dyomina A.V., Kovalenko A.A., Roginskaya A.I., Melik-Kasumov T.B., Korneeva M.A., Chuprina A.V., Zhabinskaya A.A., Kolyhan S.A., Zakharova M.V., Gryaznova M.O., Zaitsev A.V. Beneficial Effects of Probiotic Bifidobacterium longum in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24. P. 8451.

T.B. MELIK-KASUMOV, A.A. ZHABINSKAYA, A.V. CHUPRINA, V.V. SOLTANOV

EFFECTS OF PROBIOTIC BACTERIA BIFIDOBACTERIUM LONGUM AND LACTOBACILLUS RHAMNOSUS ON THE DEVELOPMENT OF PENTYLENETETRAZOLE MODEL OF EPILEPSY

State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

A comparative study of the effects of long-term use of monoprobiotics *Bifidobacterium longum* BL-05 and *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 during pentylenetetrazole kindling was carried out. It has been shown that the development of the pentylenetetrazole kindling model, along with the expected gradual increase in indicators of seizure activity, leads to characteristic changes in the behavior of animals – to the absence of extinction of activity in the open field test over time, as well as to neurodestruction in the CA1 region of the dorsal hippocampus. Use of *L. rhamnosus* slightly changes the balance of frequency and intensity of seizures in the model, but overall has a minor effect on its development. *B. longum*, on the contrary, intensify the increase in seizure activity in the model and lead to an increase in the number fully kindled animals. At the same time, both probiotics show a neuroprotective effect, expressed in the preservation of neuronal density in the CA1 region of the hippocampus. The results obtained indicate the ambiguity of the effects of probiotics on epileptogenesis and the need to use different models for a comprehensive assessment of the positive effects of the use of probiotics to correct the epileptogenesis.

Key words: probiotics, lactobacilli, bifidobacteria, epilepsy, pentylenetetrazol, hippocampus, open field.

Р. Н. ЯСЮЧЕНЯ¹, С. Б. КОНДРАШОВА², А. С. ХОЛОЛОВИЧ²,
Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ²

МИНЕРАЛЬНЫЙ СТАТУС КРЫС ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ОЖИРЕНИИ

¹ *Институт повышения квалификации и переподготовки руководящих работников и специалистов физической культуры, спорта и туризма учреждения образования «Белорусский государственный университет физической культуры», Минск, Республика Беларусь*

² *Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Проведены экспериментальные исследования содержания в крови натрия, калия, кальция, фосфора, магния и железа в условиях модели ожирения, вызванного высокожировой диетой. Результаты показывают, что развитие алиментарного ожирения у крыс приводит к увеличению индекса массы тела, уровня триглицеридов и общего холестерина в крови. Более того, диет-индуцированное ожирение приводит к существенному изменению минерального статуса организма – происходит снижение концентраций натрия, калия и железа в крови.

Ключевые слова: ожирение, холестерин, индекс массы тела, минеральный статус.

Введение. В настоящее время ожирение все чаще рассматривается как хроническое заболевание обмена веществ, которое развивается в любом возрасте [1, 2]. В том числе в последние годы все большее внимание привлекает проблема, детского и подросткового ожирения [3]. Последний факт говорит в том числе о том, что в современном мире ожирение чаще всего наряду с гиподинамией вызвано алиментарными причинами – доступностью высококалорийных продуктов с низкой пищевой ценностью, стрессовым переизбытком, формированием вредных пищевых привычек [4]. Как известно, ожирение является фактором риска кардиоваскулярных и онкологических заболеваний, непосредственно связано с развитием инсулинорезистентности и сахарного диабета второго типа. Кроме того, избыточный вес способствует развитию нарушений в работе опорно-двигательного аппарата и отягощает их течение, чаще всего в случае дорсопатий [5]. Эти эффекты ожирения во многом проявляются при длительном течении или вследствие тяжелых форм. Вместе с тем, ожирение первой степени (индекс массы тела (ИМТ) 30–35) редко приводит к существенным коморбидным патологиям в краткосрочной перспективе. При этом очевидно, что негативные последствия ожирения могут проявляться в скрытой форме, истощая со временем компенсаторные ресурсы организма. В этой связи обращает на себя внимание то, что развитие ожирения часто связано с накоплением метаболически и эндокринно активной висцеральной жировой ткани [6]. Как известно, организм человека на 25–27 % состоит из жировой ткани, которая располагается под кожей, а также вокруг внутренних органов: эпикардиальный, эпидимальный, ретроперитонеальный, мезентериальный висцеральный жир. Висцеральная, и в особенности абдоминальная жировая ткань является местом интенсивного метаболизма стероидов, с чем связывают изменение иммунореактивности при ожирении [7, 8]. Кроме того, жировая ткань является своеобразной эндокринной железой, которая секретирует ряд сигнальных молекул – адипокинов, к которым относят лептин, адипонектин, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли альфа, моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 и другие [9, 10]. Обилие цитокинов, выделяемых жировой тканью, также сказывается на перестройке обмена веществ при ожирении [11].

Одним из возможных ранних изменений при ожирении, особенно алиментарном, может являться нарушение минерального статуса [12]. Нарушение минерального статуса при развитии ожирения может иметь две основные причины. Во-первых, нарушение пищевого поведения часто может быть сопряжено с вытеснением низкокалорийной пищи, обладающей вместе с тем высокой пищевой и в особенности минеральной ценностью (растительная пища, мясные и молочные продукты), высококалорийной пищей с низкой пищевой ценностью (продукты с высоким содержанием жиров, в большей степени насыщенных, а также сахаров). При этом обеспечение

организма важными микронутриентами – незаменимыми аминокислотами, полиненасыщенными жирными кислотами, витаминами и минеральными элементами – становится недостаточным. Вторых, развитие ожирения даже на ранних этапах может быть сопряжено с перестройками метаболизма и регуляторных систем организма, которые приводят к нарушению водно-электролитного баланса непосредственно, в том числе, за счет нарушения обмена стероидов и, в частности, минералокортикоидов [13].

Описанные изменения могут также наблюдаться в случае первой степени ожирения и даже при избыточной массе тела (ИМТ 25–30). В этой связи особенно актуально изменение отношения к таким умеренным формам ожирения. Показано, что у людей с первой степенью ожирения может не наблюдаться существенных рисков развития коморбидных патологий. Последние исследования показывают, что в таких случаях ключевым фактором может быть достаточная оксигенация жировой ткани [14]. Такой фенотип предложено называть «метаболически здоровым ожирением», для которого характерен ИМТ более 30 без признаков развития метаболического синдрома по критериям Третьей Национальной образовательной программы США по гиперхолестеринемии [15]. В концепции «метаболически здорового ожирения» ключевую роль играет улучшенная метаболическая и эндокринная активность жировой ткани. Вместе с тем, требуются дополнительные экспериментальные и клинические исследования, подтверждающие не только сниженный риск развития осложнений такой формы ожирения, но и уменьшение его влияния на метаболические изменения, характерные для ожирения в целом, и в частности на минеральный статус.

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей развития ожирения у крыс и его влияния на минеральный статус организма.

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали самцов крыс Wistar с первоначальной массой тела 150 г, которые были разделены на следующие группы: 1 группа – контроль, интактные животные, находившиеся на стандартном рационе (n=10); 2 группа – крысы, у которых моделировали алиментарное ожирение (добавление к основному рациону жирового компонента) (n=10). Эксперименты проведены с соблюдением принципов биоэтики согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986).

Модель алиментарного ожирения создавали путем добавления к стандартному рациону пищевых жиров животного происхождения (4 г свиного сала на животное в сутки, 32 ккал) в течение 9 недель [16]. У животных проводили мониторинг массы тела до начала и каждую неделю в течение эксперимента. Индекс массы тела вычисляли по формуле:

$$\text{ИМТ} = \frac{m}{l^2};$$

где ИМТ – индекс массы тела, m – масса тела (г), l – длина тела от носа до основания хвоста (см).

По завершении хронического эксперимента животных наркотизировали (внутрибрюшинное введение тиопентала натрия 70 мг/кг), декапитировали, смешанную кровь собирали в пробирки с последующим центрифугированием 15 минут при 3000 об/мин на центрифуге LMC-3000 («Biosan», Латвия). Полученную сыворотку разливали на аликвоты, замораживали и хранили при 20°C.

Определение концентрации в сыворотке крови исследуемых показателей (общий холестерин, липопротеиды высокой плотности, липопротеиды низкой плотности, триглицериды, общие липиды, глюкоза, натрий, калий, кальций, фосфор, железо, магний) осуществляли с помощью стандартных наборов (Анализ-Х, Беларусь), руководствуясь прилагаемыми к ним инструкциями. Измерение оптической плотности анализируемых проб проводили на планшетном фотометре BioTek ELx 808 (BioTek Instruments, США).

Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программы Statistica 10. Для анализа повторных измерений (масса тела, ИМТ) использовали однофакторный дисперсионный анализ с применением критерия Стьюдента для попарных сравнений *a posteriori*. Для межгруппового сравнения биохимических показателей использовали критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде средней и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. Дополнительное потребление животных жиров приводило к постепенному ускорению роста массы тела крыс опытной группы (рисунок 1). Статистически значимыми отличия становились на 6-й неделе эксперимента и оставались таковыми до его

завершения. В конце девятой недели средняя масса крыс опытной группы была на 37 % выше показателя контрольной группы.

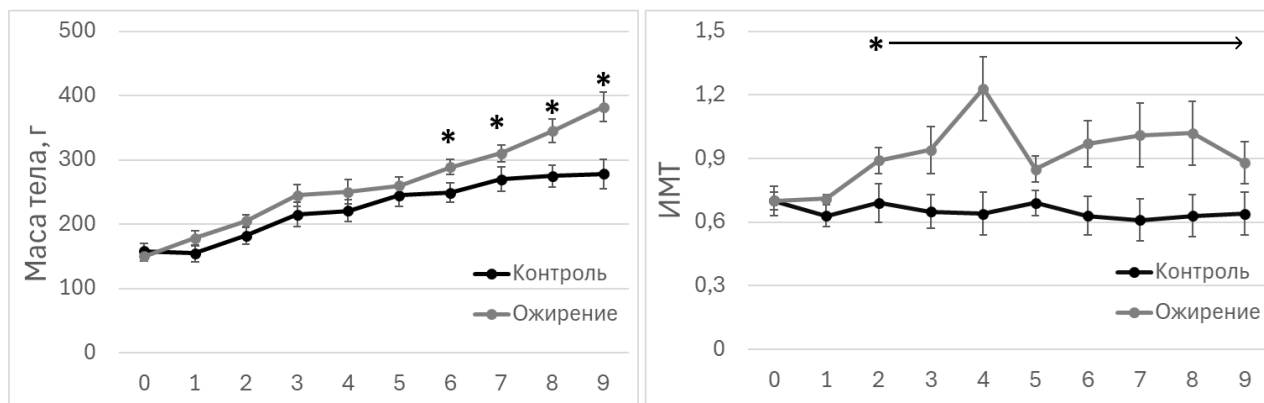


Рис. 1. Динамика изменения массы тела и ИМТ у крыс двух экспериментальных групп

Примечание: * – $p < 0,05$ к контрольной группе в той же точке по критерию Стьюдента

Динамика изменения индекса массы тела несколько отличалась. В этом случае отличия между группами становились значимыми уже через 2 недели после начала эксперимента. Во многом это определялось относительной стабильностью показателя в контрольной группе. Если в контрольной группе ИМТ оставался стабильным в течение всего периода ($0,65 \pm 0,08$), то в опытной группе показатель после первоначального подъёма на 2-й неделе колебался в пределах 0,9–1,2, всегда оставаясь существенно выше контрольных значений.

Таким образом, развитие диет-индуцированного ожирения наиболее точно характеризуется именно индексом массы тела, учитывая сравнительно длительную фазу роста в онтогенезе лабораторных животных.

Среди биохимических показателей, проанализированных на завершающей стадии эксперимента, на развитие алиментарного ожирения указывали повышенный уровень общего холестерина – на 13 % выше контрольных значений, и триглицеридов – на 31 % выше контрольных значений (таблица 1). Вместе с тем, девятинедельное потребление дополнительного источника животных жиров не приводило к существенному изменению уровня липопротеидов различной плотности, общего уровня липидов и глюкозы, что можно объяснить сравнительно умеренным изменением рациона без добавления источника моно- и дисахаридов, как это используется в других моделях ожирения [17].

Табл. 1. Основные биохимические показатели в сыворотке крови крыс двух экспериментальных групп

Показатель	Единица измерения	Контроль	Ожирение
Общий холестерин	мМ	$1,64 \pm 0,15$	$1,86 \pm 0,10^*$
ЛПВП	мМ	$0,78 \pm 0,11$	$0,93 \pm 0,09$
ЛПНП	мМ	$1,19 \pm 0,13$	$1,13 \pm 0,09$
Триглицериды	мМ	$1,47 \pm 0,17$	$1,93 \pm 0,17^*$
Общие липиды	г/л	$4,87 \pm 0,36$	$5,31 \pm 0,34$
Глюкоза	мМ	$4,53 \pm 0,43$	$4,93 \pm 0,31$
Натрий	мМ	$165,23 \pm 3,04$	$132,44 \pm 5,54^*$
Калий	мМ	$8,28 \pm 0,54$	$6,96 \pm 0,29^*$
Кальций	мМ	$3,80 \pm 0,16$	$3,57 \pm 0,28$
Фосфор	мМ	$2,30 \pm 0,21$	$1,94 \pm 0,18$
Железо	мМ	$19,59 \pm 0,47$	$17,27 \pm 0,56^*$
Магний	мМ	$0,73 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,01$

Примечание: * – $p < 0,05$ к контрольной группе по критерию Манна-Уитни

Развитие ожирения приводило к значительному изменению содержания некоторых минеральных элементов в сыворотке крови. В частности, содержание натрия уменьшалось на 20 %, калия – на 17 %, а железа – на 12 % по сравнению с контрольными значениями. Концентрации кальция, магния и фосфатов в контрольной и опытной группах значимо не отличались.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что добавление к основному рациону жиров животного происхождения в течение девяти недель приводит к развитию у крыс

алиментарного ожирения, что находит подтверждение в ускорении набора массы тела к шестой неделе, в увеличении индекса массы тела начиная со второй недели, но его сохранению на установленном уровне до конца эксперимента, и росту уровня общего холестерина и триглицеридов. При этом на фоне не столь значительных изменений в нутритивном статусе, происходит существенное изменение минерального статуса у крыс – снижается уровень железа, натрия и калия. Понижение уровня калия и натрия может быть следствием их относительного уменьшения в рационе за счет частичного замещения стандартного рациона жировым компонентом. Другими словами, животные в меньшей степени потребляют корм с полноценным пищевым составом за счет потребления более калорийного животного жира с более низкой минеральной ценностью. Кроме того, снижение содержания этих элементов во внутренней среде организма может быть обусловлено теми метаболическими и физиологическими изменениями, которые вызваны развивающимся ожирением. Последнее в большей степени может быть отнесено к снижению уровня железа, так как этот эффект был показан в других моделях ожирения [18, 19].

Заключение. Результаты проведенного исследования показывают, что развитие алиментарного ожирения у крыс приводит прежде всего к изменению биометрических показателей, а также к увеличению уровня триглицеридов и общего холестерина в крови. Однако наиболее важно, что развитие диет-индуцированного ожирения приводит к существенному изменению минерального статуса – происходит снижение концентрации в крови натрия, калия и железа.

Литература:

- [1] Hurt R.T., Wilson T. Geriatric obesity: evaluating the evidence for the use of flavonoids to promote weight loss // *J Nutr Gerontol Geriatr*. 2012. Vol.31. P. 269–289.
- [2] Jura M., Kozak L.P. Obesity and related consequences to ageing // *Age (Dordr)*. 2016. Vol.38. P. 23.
- [3] Lister N.B., Baur L.A., Felix J.F., Hill A.J., Marcus C., Reinehr T., Summerbell C., Wabitsch M. Child and adolescent obesity // *Nat Rev Dis Primers*. 2023. Vol.9. P. 24.
- [4] Litwin M., Kulaga Z. Obesity, metabolic syndrome, and primary hypertension // *Pediatr Nephrol*. 2021. Vol.36. P. 825–837.
- [5] Zhou J. et al. Causal Associations of Obesity With the Intervertebral Degeneration, Low Back Pain, and Sciatica: A Two-Sample Mendelian // *Randomization Study*. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. Vol.12. P. 740200.
- [6] Ross R. et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity // *Nat Rev Endocrinol*. 2020. Vol.16. P. 177–189.
- [7] Matarese G. The link between obesity and autoimmunity // *Science*. 2023. Vol. 379. P.1298–1300.
- [8] Amin M.T., Fatema K., Arefin S., Hussain F., Bhowmik D.R., Hossain M.S. Obesity, a major risk factor for immunity and severe outcomes of COVID-19 // *Biosci Rep*. 2021. Vol. 41. P. BSR20210979.
- [9] Pestel J., Blangero F., Watson J., Pirola L., Eljaafari A. Adipokines in obesity and metabolic-related-diseases // *Biochimie*. 2023. Vol. 212. P.48–59.
- [10] Taylor E.B. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity // *Clin Sci (Lond)*. 2021. Vol. 135. P.731–752.
- [11] Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease // *Nat Rev Immunol*. 2011. Vol. 11. P. 85–97.
- [12] Kobylińska M. et al. K. Malnutrition in Obesity: Is It Possible? // 2022. *Obes Facts*. Vol. 15. P. 19–25.
- [13] Calcaterra V. et al. Micronutrient Deficiency in Children and Adolescents with Obesity-A Narrative Review // *Children (Basel)*. 2023. Vol. 10. P. 695.
- [14] Goossens G.H. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function // *Obes Facts*. 2017. Vol. 10. P. 207–215.
- [15] Бондаренко В.М., Пиманов С.И., Макаренко Е.В., Бондаренко Е.Ф. Метаболически здоровое ожирение: факторы, влияющие на стабильность и прогноз // *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2023. №4. С.21–32.
- [16] Чурин Б.В. и др. Макро-микроэлементный состав легочной ткани при алиментарном ожирении // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 8 (часть 1). С. 179–183.
- [17] Mityukova T.A., Basalai A.A., Poluliakh O.Y., Kuznetsova T.E. Effects of high-calorie diet-induced visceral obesity on reproductive hormones and muscle tissues in male and female Wistar rats // *Global Translational Medicine*. 2024. Vol. 3. P. 2321.
- [18] Masanova V. et al. Effects of Ovariectomy and Exercise Training on Mineral Status in a High-Fat Diet-Induced Obesity Rat Model // *Biol Trace Elem Res*. 2022. Vol. 200. P. 624–634.
- [19] Chen S.-H., Yuan K.-C., Lee Y.-C., Shih C.-K., Tseng S.-H., Tinkov A.A., Skalny A.V., Chang J.-S. Iron and Advanced Glycation End Products: Emerging Role of Iron in Androgen Deficiency in Obesity // *Antioxidants (Basel)*. 2020. Vol. 9. P.261.

R. N. YASYUCHENYA¹, A. S. KHOLOLOVICH², S. B. KONDRASHOVA²,
T. B. MELIK-KASUMOV²

MINERAL STATUS OF RATS WITH NUTRITIONAL OBESITY

¹ *Institute for Advanced Training and Retraining of Managers and Specialists in Physical Culture, Sports and Tourism, Educational Institution “Belarusian State University of Physical Culture”, Minsk, Republic of Belarus*

² *State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus*

Summary

Changes in the blood levels of sodium, potassium, calcium, phosphorus, magnesium and iron were studied in a model of obesity caused by a high-fat diet. The results show that the development of diet-induced obesity in rats leads to an increase in body mass index, triglyceride levels and total cholesterol in the blood. Moreover, the development of obesity leads to a significant change in mineral status – there is a significant decrease in the blood level of sodium, potassium and iron.

Key words: obesity, cholesterol, body mass index, mineral status.

УДК 616.611-002:612.017.7

М. В. ДМИТРИЕВА¹, В. В. САВОШ¹, З. Н. БРАГИНА¹, С. Н. РЯБЦЕВА², Т. А. ЛЕТКОВСКАЯ¹

СТРУКТУРА И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ С МЕЗАНГИОКАПИЛЛЯРНЫМ КЛУБОЧКОВЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь

² Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии
наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Изучены морфологические изменения (с использованием данных световой и люминесцентной микроскопии) ткани почки при гломерулонефритах с мезангиокапиллярным повреждением клубочков. Дана гендерно-возрастная характеристика и проведен анализ клинических проявлений у пациентов. Отмечены клиничко-морфологические отличия случаев в зависимости от функции почек.

Ключевые слова: мезангиокапиллярный гломерулонефрит, морфология, иммунные комплексы, функция почек.

Введение. Гломерулонефриты (ГН) с мезангиокапиллярным (МезК) паттерном составляют около 10 % всех случаев гломерулярных заболеваний [1] и занимают третье место среди всех форм ГН в структуре причин терминальной почечной недостаточности [2]. Распространенность мезангиокапиллярных гломерулонефритов (МезК ГН) среди всех случаев ГН в западноевропейских странах составляет от 4,6 % до 11,3 %, в США – 1,2 % [3]. В странах Восточной Европы, Азии и Африки этот показатель достигает 30 % [4]. Вторичные формы чаще затрагивают взрослых старше 30 лет и могут развиваться на фоне инфекционной, опухолевой и системной патологии. В ходе проведения научно-исследовательской работы были проанализированы клинические данные и морфологические изменения в нефробиоптатах у пациентов с морфологически подтвержденным мезангиокапиллярным гломерулонефритом.

Материалы и методы исследования. Изучены морфологические характеристики нефробиопсий и данные биопсийных карт пациентов с гистоморфологическим диагнозом МезК ГН. Микропрепараты были окрашены гематоксилином-эозином, реактивом Шиффа, трихромом по Массону, конго-красным и серебром по Джонсу. Данный набор гистохимических окрасок был использован для верификации диагноза «мезангиокапиллярный гломерулонефрит». Иммунофлюоресцентное исследование проведено с иммуноглобулинами классов G, A, M, компонентами комплемента C3 и C1q. В одном случае выполнено электронно-микроскопическое исследование фрагмента почечной ткани. Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q25%; Q75%). Статистическая обработка проведена с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. Случаи МезК ГН (n=20) составили 2,9 % среди 694 исследованных нефробиопсий почек за пятилетний период. В анализируемых нефробиоптатах было представлено от 8 до 59 клубочков, медиана количества клубочков составила 15 (10;25) в биопсийном материале одного пациента. Возраст пациентов колебался от 20 до 67 лет, медиана возраста была 41 (31;56) лет. Соотношение мужчин и женщин было равным (М:Ж=1:1).

В состав первичных форм (13/65 %) вошли 10 (76,9 %) случаев идиопатического МезК ГН и три (23,1 %) случая С3-гломерулопатии. Вторичные формы МезК ГН (7/35 %) у пяти (71,4 %) пациентов были ассоциированы с гепатитом С. В одном (14,3%) случае МезК ГН развился на фоне карциномы поджелудочной железы с метастазами в легкие, ещё в одном (14,3 %) – на фоне хронического лимфолейкоза. МезК ГН, диагностированный в сочетании с вирусным гепатитом С, у двух (28,6 %) пациентов сопровождался криоглобулинемическим васкулитом, который был подтвержден положительным титром криоглобулинов в сыворотке крови.

Клиническая картина у 11 (57,9 %) пациентов с МезК ГН демонстрировала нефритический синдром, в пяти (26,3 %) случаях – нефротический, в двух (10,5 %) наблюдениях диагностирован изолированный мочевой синдром, по одному пациенту имели быстро прогрессирующее снижение функции почек (1/5,3 %) и острую почечную недостаточность (1/5,3 %).

Гистологические проявления МезК ГН характеризовались особенностями поражения клубочков, среди которых нами отмечены дольчатость, мезангиальная пролиферация, утолщение и расщепление гломерулярных базальных мембран при окраске серебром по Джонсу и интерпозиция мезангия в периферические отделы гломерул (рисунок 1, А). В биопсийном материале половины анализируемых случаев (10/50 %) обнаружена пролиферация клеток капсулы Шумлянського в виде полулуний в клубочках. У пациентов с наличием в нефробиоптатах клубочковых полулуний отсутствовали различия по уровням мочевины ($p=0,066$), креатинин ($p=0,870$) и протеинурии ($p=0,934$) по сравнению с пациентами без клеточных полулуний в клубочках.

При иммунофлюоресцентном исследовании экспрессия иммуноглобулинов класса G в мезангиальном матриксе и по ходу гломерулярных базальных мембран выявлена во всех (20/100 %) биоптатах (рисунок 1Б), в 12 (60 %) анализируемых фрагментах ткани почки наблюдалось свечение компонента комплемента C3, в 9 (45 %) случаях – иммуноглобулинов класса M. В восьми (40 %) почечных биоптатах выявлялась клубочковая экспрессия C1q компонента комплемента по ходу базальных мембран клубочков и в зонах мезангия, у четырех (20 %) пациентов этот компонент определялся в участках гломерулосклероза.

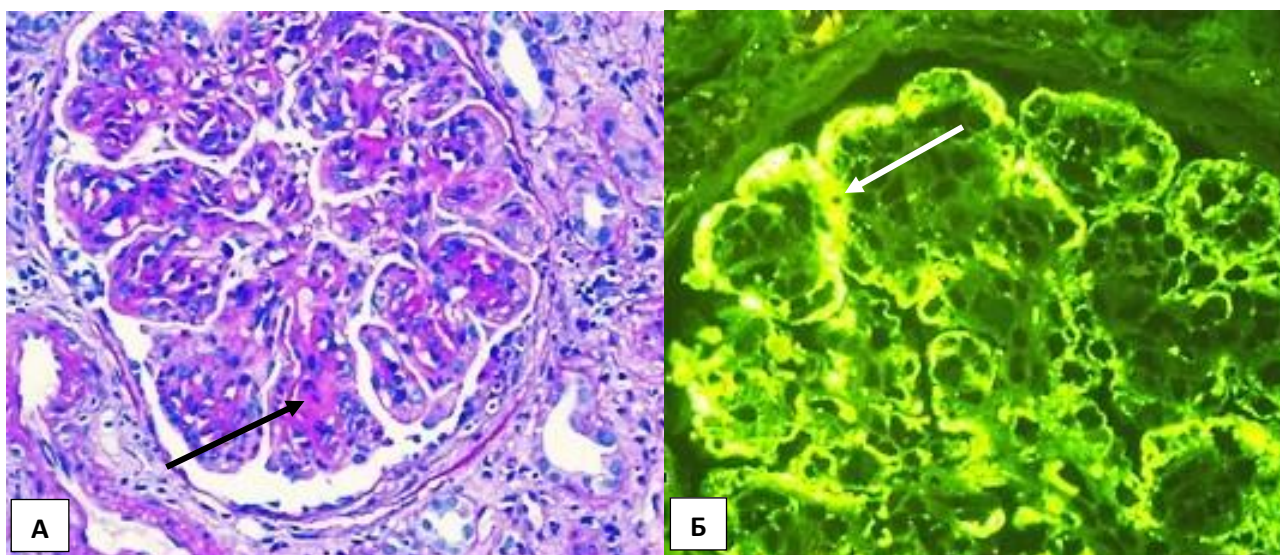


Рис. 1. Изменения в клубочках при мезангиокапиллярном гломерулонефрите: А – дольчатая структура клубочка, мезангиальная пролиферация, утолщение базальных мембран (стрелка, реактив Шиффа, $\times 200$); Б – экспрессия иммуноглобулинов класса G в сосудистых дольках (стрелка, FITC, $\times 400$)

Морфологические проявления криоглобулинемического поражения почек характеризовались МезК ГН с наличием криоглобулов в капиллярных петлях клубочков, диагностируемых при окраске гематоксилином-эозином (рисунок 2, А), при иммунофлюоресценции наряду с экспрессией иммуноглобулинов в мезангиальном матриксе и базальных мембранах капилляров, определялось свечение иммуноглобулинов классов M и G в криоглобулах капиллярных петель (рисунок 2, Б).

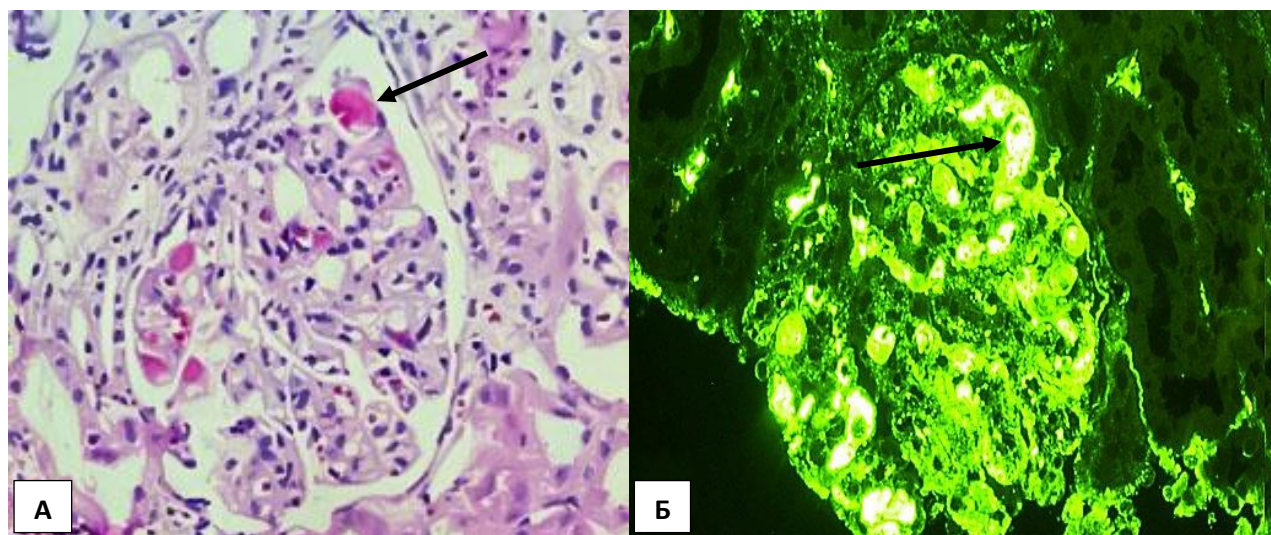


Рис. 2. Изменения в клубочках при криоглобулинемическом васкулите: А –криоглобулы в капиллярных петлях клубочка, (стрелка, окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$); Б – экспрессия иммуноглобулинов класса М в мембранах, мезангии и криоглобулах (стрелка, FITC, $\times 200$)

При электронно-микроскопическом исследовании в клубочке выявлялись плотные депозиты, локализованные субэндотелиально в базальной мембране (рисунок 3). Утолщение базальных мембран клубочков, видимое при световой микроскопии, собственно, и есть результат отложений электронно-плотных депозитов, а также слоев мембраноподобного вещества, образованного мигрирующими мезангиоцитами и эндотелиальными клетками [5].

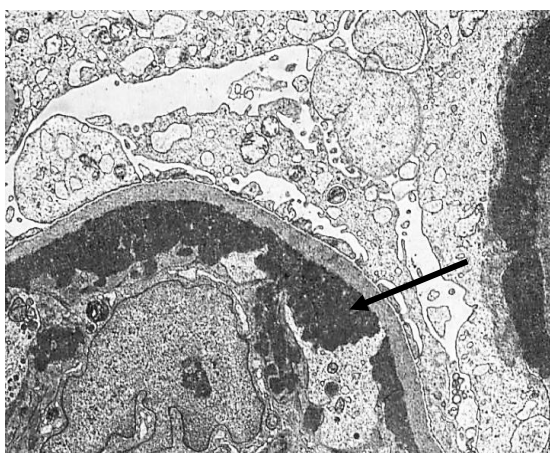


Рис. 3. Субэндотелиальные электронно-плотные депозиты в базальной мембране клубочка (стрелка, электронная микроскопия, $\times 4150$)

Поскольку нарушение функции почек является одним из важных критериев клинического течения МезК ГН и ГН в целом, нами проведено сравнение клинических и морфологических показателей у пациентов с нарушенной и сохраненной функцией почек, исследованной на момент выполнения нефробиопсии (таблица).

Табл. Сравнение клинических и морфологических показателей при мезангиокапиллярных формах гломерулонефрита в зависимости от функции почек

Признак	Функция почек		Статистическая значимость различий
	Нарушена, n=7	Сохранена, n=13	
Возраст, лет, Ме	57 (48;66)	36 (31;50)	$p=0,014^*$
Протеинурия, г/л, Ме	2,6 (1,5;33,0)	3,8 (1,0;5,7)	$p=0,966$
Артериальная гипертензия, абс.(%)	7 (100)	7 (53,8)	$p=0,032^*$
Процент клубочков с полулуниями, Ме	20,7 (9,1;33,3)	12,5 (9,1;25,0)	$p=0,917$
Процент клубочков с глобальным склерозом, Ме	10,0 (8,3;26,7)	12,1 (1,9;25,9)	$p=0,612$

Продолжение таблицы

Процент клубочков с сегментарным склерозом, Ме	0,0 (0,0;18,2)	1,4 (0,0;33,2)	$p=0,331$
Эндотелиальная пролиферация, абс. (%)	5 (71,4)	9 (69,2)	$p=0,919$
Процент интерстициального фиброза, Ме	50 (35;70)	15 (2,5;25)	$p=0,002^*$

Примечание: * – статистически значимые различия между двумя группами

Выявлено, что пациенты с почечной недостаточностью были более старшего возраста ($p=0,014$). Нарушение функции почек чаще сопровождалось развитием артериальной гипертензии ($p=0,032$) и сочеталось с более высоким процентом интерстициального фиброза ($p=0,002$) в ткани почки. Пациенты не различались по уровням протеинурии, а также удельному весу клубочков с клеточными полулуниями, глобальным и сегментарным гломерулосклерозом и эндотелиальной пролиферацией в нефробиоптатах ($p>0,05$ – для каждого параметра, таблица).

Заключение. Гломерулонефриты с мезангиокапиллярным паттерном представляют гетерогенную группу заболеваний, большая часть которых (65 %) является первичными формами ГН. Развитие вторичных форм МезК ГН наиболее часто связано с вирусными гепатитами (5/71,4 %). Нарушение функции почек наблюдается у пациентов старшего возраста ($p=0,014$), сопровождается более частым развитием артериальной гипертензии ($p=0,032$) и сочетается с более высоким процентом интерстициального фиброза ($p=0,002$), свидетельствующего о необратимых изменениях в ткани почки.

Литература:

- [1] Colville D. et al. Visual Impairment Caused by Retinal Abnormalities in Mesangiocapillary (Membranoproliferative) Glomerulonephritis Type II ("Dense Deposit Disease"). Am. J. Kid. Dis. 2003. Vol. 42, № 2. e3.1–e3.4.
- [2] Rogers T. E., Rakheja D., Zhou X. J. Glomerular diseases associated with nephritic syndrome and/or rapidly progressive glomerulonephritis. Silva's diagnostic renal pathology: Cambridge University Press, 2009. P. 178–228.
- [3] Воробьев А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М: Медицинское информационное агенство, 2012. 704 с.
- [4] Скворцов В. В. и др. Актуальные вопросы лабораторной диагностики и лечения гломерулонефрита / Поликлиника. 2015. № 4. С. 48–54.
- [5] Jennette J. C. et al. Heptinstall's pathology of the kidney. Phil.: Lippincott Williams & Wilkins. 2014. 756 p.

M. V. DMITRIEVA¹, V. V. SAVOSH¹, Z. N. BRAGINA¹, S. N. RJABCEVA²,
T. A. LETKOVSKAJA¹

STRUCTURE AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF GLOMERULONEPHRITIS WITH MESANGIOCAPILLARY GLOMERULAR PATTERN

¹ Educational institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

² State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus

Summary

Variants and morphological changes (using data of light and luminescent microscopy) of kidney tissue in glomerulonephritis with mesangiocapillary pattern were studied. Gender-age characteristics and analysis of clinical manifestations in patients were given. Clinical and morphological comparisons of cases depending on renal function were carried out.

Key words: mesangiocapillary glomerulonephritis, morphology, immune complexes, kidney function.

УДК 612.825:616.36-008.811.4]-018:599.323.4

Т. В. КЛИМУТЬ¹, А. В. ЗАЕРКО¹, С. В. ЕМЕЛЬЯНЧИК², С. М. ЗИМАТКИН¹

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ПОЯСНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

¹ Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки
Купалы», Гродно, Республика Беларусь

Установлено, что на пике холестаза (на 10–20-е сутки после перевязки и перерезки общего желчного протока) у крыс уменьшается число нейронов на единицу площади мелкоклеточного и крупноклеточного слоев поясной коры. По мере развития холестаза в поясной коре происходит постепенное уменьшение размеров нейронов и их ядер, которое достигает максимума на 5-е, 10-е, 20-е сутки в мелкоклеточном слое и на 10-е, 20-е, 45-е сутки в крупноклеточном слое. При этом перикарионы нейронов вытягиваются и их сферичность уменьшается. Следовательно, нейроны мелкоклеточного слоя быстрее реагируют на холестаз, а сохранившиеся нейроны быстрее восстанавливаются. В дальнейшем через 45–90 суток после перерезки ОЖП происходит постепенная нормализация размеров и формы нейронов в обоих исследуемых слоях поясной коры.

Ключевые слова: поясная кора, крупноклеточный слой, мелкоклеточный слой, головной мозг, холестаз.

Введение. Холестаз – нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку. Это осложнение возникает при различной патологии печени и желчевыводящих путей, особенно часто при желчекаменной болезни, которой страдает более 10 % населения планеты [3]. Недостаточный отток желчи приводит к нарушению пищеварения (особенно жиров) в кишечнике, накоплению желчи в желчевыводящих путях, повреждению гепатоцитов и поступлению компонентов желчи (билирубин, желчные кислоты и др.) в кровь, а затем и в мозг [5].

В клинической практике отмечено, что холемическая и печеночная интоксикация оказывают сильное угнетающее действие на ЦНС. При начальных стадиях холестаза клиницистами описаны так называемые «малые симптомы» начинающейся энцефалопатии в виде головных болей, головокружений, тяжести в голове, бессонницы ночью и сонливости днем, апатии, разбитости, невозможности длительного сосредоточения внимания, памяти. Затем могут проявляться более выраженные неврологические (психические) симптомы в виде неврастения, энцефалопатии, энцефаломиелопатии и полинейропатии. При продолжении токсикоза развиваются морфологические изменения в головном мозге, которые описаны при экспериментальном подпечёночном холестазе для неокортекса, коры мозжечка и гистаминергических нейронов гипоталамуса [5].

В обеспечении многообразных функций головного мозга принимает активное участие поясная кора его больших полушарий. Она является важной частью лимбической системы, которая отвечает за эмоции, обучение, память, и её нарушения могут быть связаны с когнитивным дефицитом, депрессией, бессонницей, наблюдаемыми при холестазе [8]. Поясная кора совершенно не изучена при холестазе и её исследование поможет понять механизмы развития нейропсихических расстройств при этой патологии. Это обуславливает актуальность и важность гистологического исследования данного отдела коры мозга при холестазе и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы исследования. В работе использовано 72 беспородные белые крысы самцы массой 225±25 грамм. Контрольных и опытных животных содержали в стандартных условиях вивария Гродненского государственного медицинского университета, в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и полноценной пище. Исследование проведено в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [12]. Для моделирования подпечёночного холестаза использовали перерезку общего желчного протока (ОЖП) между двумя лигатурами на 2–3 мм ниже места слияния печеночных протоков по методу Л. С. Кизюкевича [7]. Это обусловлено тем, что перевязка выше этого уровня может не приводить к полному холестазу, а ниже

него в ОЖП впадают многочисленные протоки поджелудочной железы, перевязка которых приводит к развитию панкреатита и быстрой гибели всех животных [6]. Животным контрольной группы проводили ложную операцию с сохранением физиологического оттока желчи в двенадцатиперстную кишку на протяжении всего эксперимента. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток в утренние часы опытных и контрольных животных синхронно выводили из эксперимента путем декапитации, предварительно усыпив парами эфира. Для исследования брали кусочки больших полушарий головного мозга, фиксировали их в жидкости Карнуа при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин. Фронтальные срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Препараты окрашивали по методу Ниссля (0,1 % водным раствором тионина) для оценки размеров и формы нейронов поясной извилины. Идентификацию поясной коры проводили по схемам стереотаксического атласа [13]. Морфометрию нейронов выполняли в мелкоклеточном и крупноклеточном слоях поясной извилины [1].

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Количество нейронов во 2-м, мелкоклеточном, и 5-м, крупноклеточном, слоях поясной коры всех исследованных животных подсчитывали на 1000 мкм² площади этих слоёв. Оценку размеров и формы перикарионов и ядер нейронов этих слоёв проводили, обводя курсором контуры их перикарионов и ядер на экране монитора, с получением следующих параметров: минимального и максимального диаметров, периметра, площади, форм-фактора ($4\pi S/P^2$, где S – площадь сечения перикариона, P – периметр перикариона) и фактора элонгации (D_{max}/D_{min} , где D_{max} – максимальный диаметр, D_{min} – минимальный диаметр перикариона); также подсчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение.

В результате морфометрических исследований получены количественные данные. Их обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер AXAR207F394425FA-Q) с применением описательной статистики. Так как в эксперименте нами использовались малые выборки, которые не всегда имели нормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики [2]. Для каждого показателя определяли значение медианы (Me), нижнего (LQ) и верхнего квартиля (UQ). Объекты исследования набирали в группы независимо друг от друга, поэтому сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test) [10]. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$, где p – критическое значение уровня значимости) [9].

Результаты и их обсуждение. Нейроны 2-го мелкоклеточного слоя поясной коры преимущественно овальной формы, с узким ободком цитоплазмы вокруг ядра, с плотностью расположения около 4 клеток на 1000 мкм² (рисунок 1, 2).

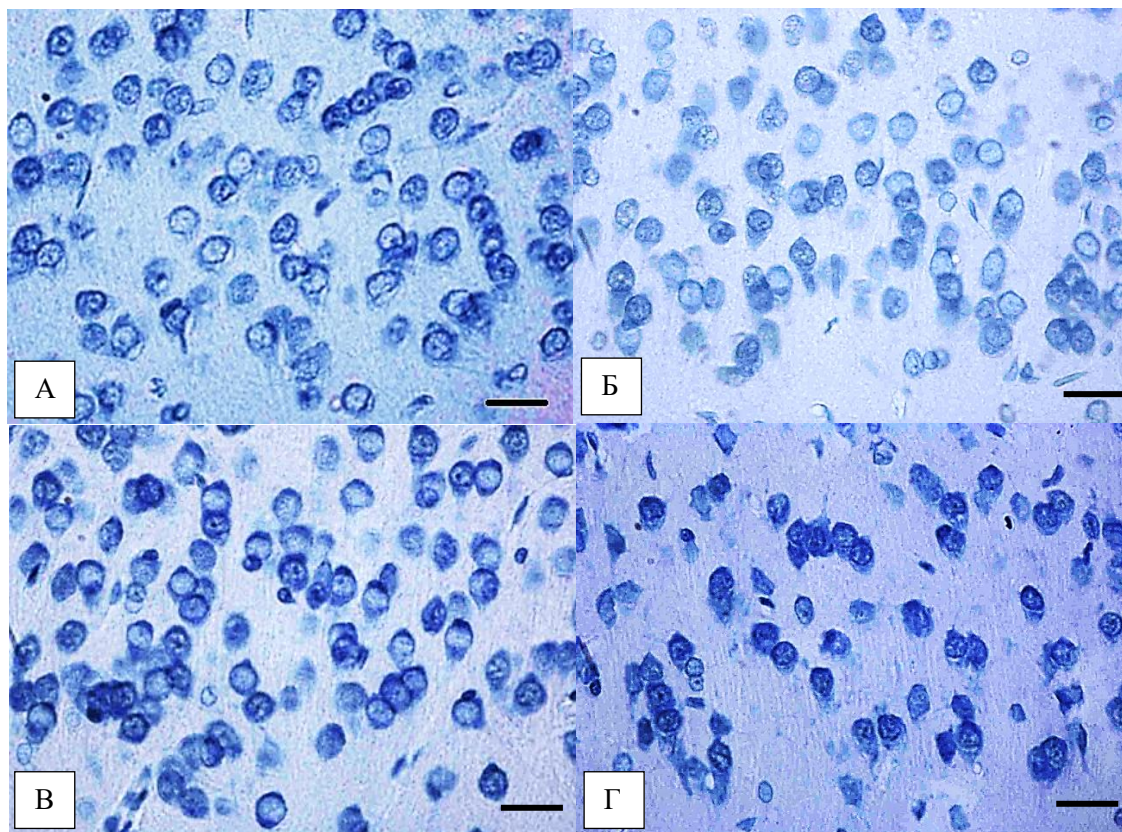


Рис. 1. Нейроны 2-ого (мелкоклеточного) слоя на 5-е (А – контроль, Б – опыт) и 10-е сутки (В – контроль, Г – опыт) после перерезки общего желчного протока, окраска по методу Ниссля, увеличение $\times 400$, масштабный отрезок 20 мкм

При подсчете количества нейронов мелкоклеточного слоя на единицу площади поясной коры установлено, что на 2-е и 5-е сутки после перерезки общего желчного протока количество нейронов по сравнению с контрольной группой достоверно не изменяется. Начиная с 10-х суток у животных опытной группы количество нейронов значительно снижается (на 32,2 %), и это снижение сохраняется во все более поздние сроки исследования (рисунок 1, 2).

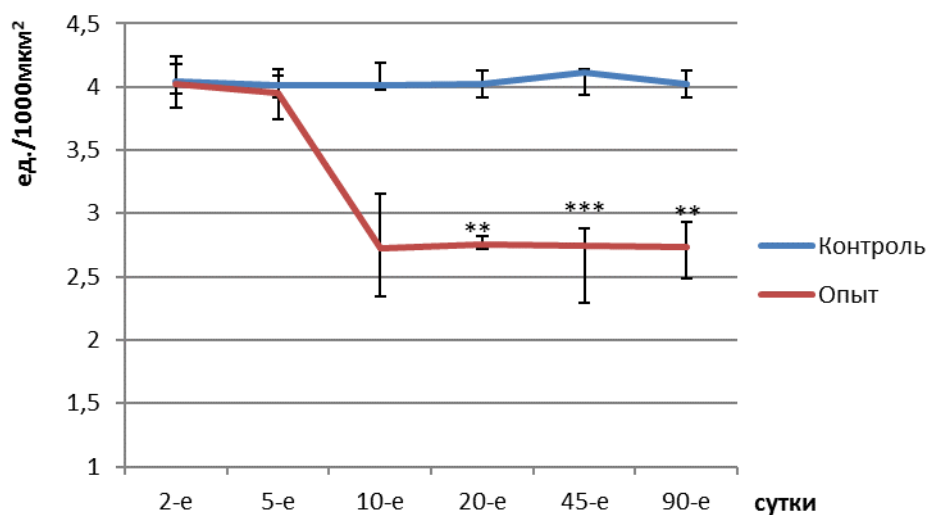


Рис. 2. Количество нейронов мелкоклеточного слоя на единицу площади поясной коры

При анализе размеров и формы нейронов мелкоклеточного слоя установлено, что через 2-е суток после перерезки ОЖП значительные изменения не выявляются. На 5-е сутки после перерезки ОЖП происходит уменьшение площади перикарионов нейронов мелкоклеточного слоя на 6,2 % ($p < 0,001$), их большего радиуса – на 5,6 % ($p < 0,001$), периметра – на 4,3 % ($p < 0,001$), форм-фактора – на 4,5 % ($p < 0,01$). При этом увеличивается фактор их элонгации – на 9,6 % ($p < 0,001$). На 10-е сутки в

сохранившихся нейронах уменьшена площадь перикарионов – на 5,3 % ($p<0,05$), большой радиус – на 4,8 % ($p<0,001$), периметр – на 3,3 % ($p<0,05$), а фактор элонгации увеличен – на 7,2 % ($p<0,001$). На 20-е сутки уменьшен малый радиус – на 2,6 % ($p<0,05$), форм-фактор – на 2,3 % ($p<0,01$), а фактор элонгации увеличен на – 6,4 % ($p<0,01$). На 45-е и 90-е сутки после перевязки ОЖП в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры достоверных изменений морфометрических параметров не наблюдается (табл. 1). При анализе размеров и формы ядер нейронов мелкоклеточного слоя поясной коры установлено, что у крыс опытной группы на 2-е и 5-е сутки после перерезки ОЖП не выявляется значительных изменений.

Табл. 1. Показатели размеров и формы перикарионов нейронов мелкоклеточного слоя поясной коры, окраска по методу Ниссля (Me (LQ;UQ))

Параметры		2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Площадь, мкм ²	К	72,82 (69,97;74,42)	73,85 (67,08;82,65)	75,66 (69,67;84,26)	79,53 (71,22;91,63)	84,30 (75,94;97,13)	93,70 (77,16;145,57)
	О	71,92 (69,34;73,92)	69,21 (63,02;75,48) ***↓	71,67 (66,65;78,84) *↓	76,38 (71,56;86,34)	83,65 (81,37;87,44)	94,24 (81,22; 116,92)
Большой радиус, мкм	К	12,07 (11,31;12,81)	11,55 (10,69;12,56)	12,01 (11,19;13,02)	12,11 (11,35;12,87)	13,27 (11,86;14,51)	13,90 (13,43;14,98)
	О	11,73 (11,10;12,69)	10,53 (9,91;11,23) ***↓	11,43 (10,71;12,01) ***↓	11,97 (11,41;12,68)	13,21 (12,51;13,94)	13,77 (11,08;15,31)
Малый радиус, мкм	К	9,03 (8,25;9,67)	8,29 (7,87;8,86)	8,31 (7,72;8,67)	8,35 (7,83;9,13)	8,50 (7,92;9,04)	9,99 (9,24;10,99)
	О	9,00 (8,28;9,60)	8,28 (7,85;8,75)	8,07 (7,61;8,46)	8,13 (7,77;8,77) *↓	8,42 (8,05;9,07)	9,89 (8,30;13,05)
Фактор элонгации	К	1,35 (1,20;1,53)	1,25 (1,15;1,36)	1,38 (1,27;1,50)	1,40 (1,31;1,56)	1,57 (1,39;1,76)	1,39 (1,27;1,56)
	О	1,32 (1,20;1,47)	1,37 (1,23;1,53) ***↑	1,48 (1,35;1,61) ***↑	1,49 (1,38;1,63) ***↑	1,54 (1,42;1,67)	1,37 (1,25;1,48)
Периметр, мкм	К	34,61 (33,22;36,44)	32,56 (30,79;34,72)	33,49 (31,68;35,43)	33,88 (31,76;35,98)	36,91 (34,02;39,43)	39,94 (38,43;42,35)
	О	34,51 (32,19;36,87)	31,15 (29,41;32,57) ***↓	32,39 (31,53;33,98) *↓	33,77 (32,10;35,90)	36,92 (35,79;39,04)	39,90 (32,40;45,02)
Форм- фактор	К	0,88 (0,84;0,91)	0,88 (0,85;0,91)	0,86 (0,85;0,90)	0,88 (0,85;0,91)	0,81 (0,76;0,85)	0,86 (0,82;0,89)
	О	0,88 (0,84;0,91)	0,84 (0,81;0,88) **↓	0,86 (0,82;0,89)	0,86 (0,83;0,90) **↓	0,81 (0,75;0,85)	0,88 (0,84;0,91)

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$ при сравнении с контролем того же срока.

На 10-е сутки после перерезки ОЖП происходит уменьшение площади ядер сохранившихся нейронов на 13,9 % ($p<0,01$), большого радиуса – на 5,6 % ($p<0,001$), малого радиуса – на 7,1 % ($p<0,001$), периметра – на 10,3 % ($p<0,001$). На 20-е сутки достоверно меньше площадь ядер – на 11,9 % ($p<0,001$), периметр – на 1,6 % ($p<0,05$), при малый диаметр выше – на 1,5 % ($p<0,05$), форм-фактор – на 3,6 % ($p<0,05$). При этом у опытных животных происходит увеличение ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) на 5 сутки после перерезки ОЖП на 14,9 %, на 10 сутки – на 10,1 %, на 45 сутки – на 4,1 % (табл. 2). На 45-е и 90-е сутки после перевязки ОЖП не наблюдается достоверных изменений изученных морфометрических параметров ядер (табл. 2).

Табл. 2. Показатели размеров и формы ядра и ЯЦО нейронов мелкоклеточного слоя поясной коры, окраска по методу Ниссля (Me (LQ; UQ))

Параметры		2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Площадь, мкм ²	К	45,94 (43,50;48,89)	48,28 (43,80;53,50)	60,30 (46,91;71,60)	61,60 (58,37;65,02)	62,29 (58,10;67,03)	64,73 (52,45;89,27)
	О	45,29 (43,28;47,62)	47,75 (41,96;53,09)	51,89 (46,91;63,26) **↓	54,23 (48,83;61,11) ***↓	59,96 (53,94;63,54)	63,81 (60,20;69,19)
Большой радиус, мкм	К	9,37 (8,94;9,75)	8,67 (8,14;9,11)	9,79 (8,50;11,39)	9,64 (8,74;10,59)	9,97 (9,12;10,85)	10,76 (10,05;11,57)
	О	9,04 (8,67;9,60)	8,59 (8,04;9,19)	8,99 (8,32;9,78) ***↓	9,77 (9,06;10,32)	9,88 (9,33;10,47)	10,19 (8,18;13,48)
Малый радиус, мкм	К	7,59 (7,15;8,18)	7,22 (6,72;7,71)	7,59 (7,10;8,28)	7,11 (6,50;7,38)	7,26 (6,81;7,86)	8,62 (8,13;9,21)
	О	7,50 (7,24;7,92)	7,08 (6,60;7,58)	7,05 (6,62;7,52) ***↓	7,22 (6,74;7,68)*↑	7,61 (7,22;8,09)	8,91 (6,66;11,04)
Фактор элонгации	К	1,20 (1,12;1,35)	1,19 (1,11;1,29)	1,27 (1,16;1,43)	1,38 (1,23;1,52)	1,36 (1,23;1,51)	1,22 (1,13;1,33)
	О	1,16 (1,11;1,21)	1,19 (1,12;1,32)	1,26 (1,17;1,39)	1,35 (1,25;1,47)	1,29 (1,19;1,41)	1,14 (1,00;1,51)
Периметр, мкм	К	27,64 (26,32;28,96)	26,3 (24,87; 27,53)	29,88 (26,29;32,37)	29,03 (27,07;30,72)	30,75 (28,88;34,28)	32,82 (30,81;34,82)
	О	27,26 (25,62;28,84)	26,04 (24,66;27,42)	26,81 (25,70;28,37) ***↓	28,55 (26,84;29,78) *↓	29,51 (27,83;31,66)	31,77 (26,17;36,06)
Форм- фактор	К	0,88 (0,84;0,92)	0,89 (0,85;0,92)	0,87 (0,84;0,90)	0,84 (0,79;0,89)	0,86 (0,80;0,89)	0,88 (0,82;0,91)
	О	0,86 (0,82;0,90)	0,89 (0,85;0,92)	0,87 (0,82;0,90)	0,87 (0,83;0,90) *↑	0,86 (0,81;0,90)	0,89 (0,63;0,97)
ЯЦО	К	1,65 (1,45; 1,97)	1,74 (1,40;2,06)	2,07 (1,51;2,63)	2,01 (1,42;2,38)	1,96 (1,47;2,44)	2,16 (1,88;2,70)
	О	1,75 (1,51;2,04)	2,00 (1,53;2,40) ***↑	2,28 (1,56;2,66) *↑	2,01 (1,45;2,54)	2,04 (1,69;3,15) ***↑	2,13 (1,82;2,34)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ при сравнении с контролем

Таким образом, наибольшие изменения в нейронах мелкоклеточного слоя поясной коры после перерезки ОЖП наблюдаются через 10 и 20 суток, что соответствует пику холестаза, по результатам биохимического анализа крови животных [4]. При этом, происходит значительное уменьшение количества нейронов, что свидетельствует о их гибели. В сохранившихся нейронах уменьшаются размеры перикарионов и ядер, увеличивается ЯЦО. При этом изменяется форма перикарионов, они становятся более вытянутыми и менее сферичными. В отдаленные сроки (45-е и 90-е) сутки после перерезки ОЖП все исследуемые показатели приходят к контрольным значениям, что возможно связано с образованием обходных желчных выводных протоков и устранением холестаза [5].

Нейроны 5-го, крупноклеточного, слоя поясной коры преимущественно овальной формы, заметно крупнее, чем в мелкоклеточном слое, с узким ободком цитоплазмы вокруг ядра, с плотностью расположения около 4 клеток на 1000 мм² (рисунок 3, 4).

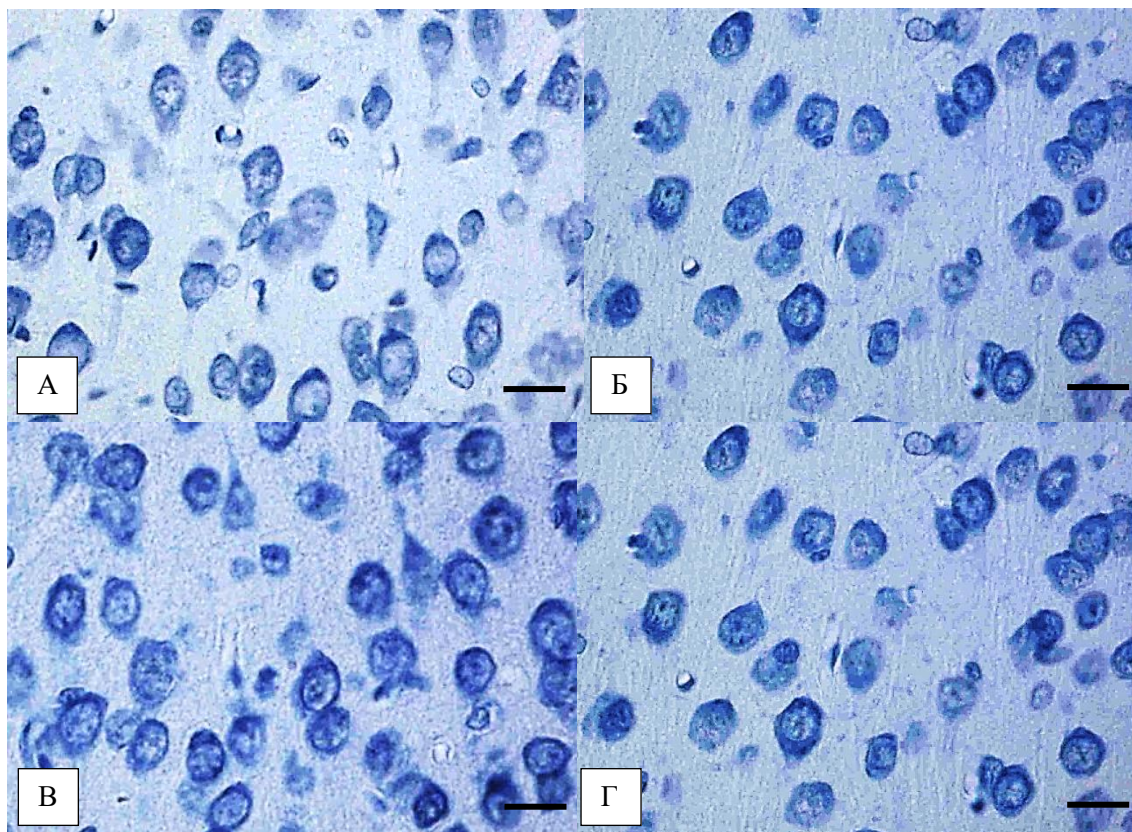


Рис. 3. Нейроны 5-ого (крупноклеточного) слоя на 10-е (А – контроль, Б – опыт) и 20-е сутки (В – контроль, Г – опыт) после перерезки общего желчного протока, окраска по методу Ниссля, масштабный отрезок 20 мкм, увеличение $\times 400$

При подсчете количества нейронов крупноклеточного слоя на единицу площади выявлено, что на 2-е и 5-е сутки после перерезки ОЖП их количество, по сравнению с контрольной группой, достоверно не изменяется. Начиная с 10-х суток у животных опытной группы количество нейронов значительно снижается: на 10-е сутки – на 19,9%, на 20-е сутки – на 34,6%, на 45-е сутки – на 35,2%, на 90-е сутки – на 35,9% (рисунок 3, 4).

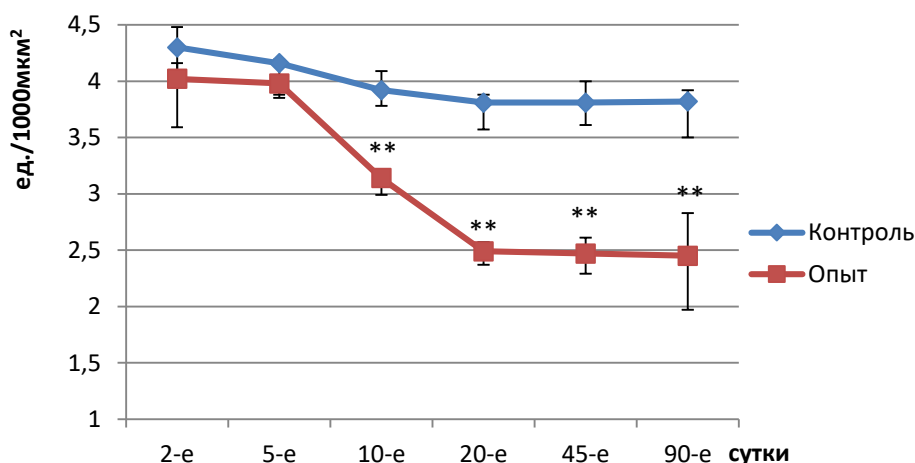


Рис. 4. Количество нейронов крупноклеточного слоя на единицу площади поясной коры

При анализе размеров и формы нейронов крупноклеточного слоя установлено, что на 5-е сутки после перерезки ОЖП происходит уменьшение форм-фактора перикарионов нейронов на 2,2 % ($p < 0,001$), периметра – на 4,6 % ($p < 0,001$). На 10-е сутки в них достоверно уменьшается площадь перикарионов на 10,7 % ($p < 0,001$), большой радиус – на 20,5 % ($p < 0,01$), малый радиус – на 15,9 % ($p < 0,001$), периметр – на 12,1 % ($p < 0,001$). На 20-е сутки площадь уменьшена на 7,7 % ($p < 0,01$), малый радиус – на 4,4 % ($p < 0,05$). На 45-е сутки уменьшены площадь перикарионов этих нейронов на

2,4 % ($p<0,001$), малый радиус – на 10,0 % ($p<0,001$), форм-фактор – на 4,7 % ($p<0,01$), периметр – на 4,0 % ($p<0,001$), а фактор элонгации увеличен на 6,8 % ($p<0,001$). Через 90 суток после перевязки ОЖП в морфометрических параметрах сохранившихся нейронов крупноклеточного слоя поясной коры не наблюдается достоверных изменений (табл. 3, рисунок 4).

Табл. 3. Показатели размеров и формы перикарионов нейронов крупноклеточного 5-го слоя поясной коры, окраска по методу Ниссля (Me (LQ; UQ))

Параметры		2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Площадь, мкм ²	K	82,77 (77,79;86,02)	86,20 (75,81;97,86)	93,50 (83,60;104,74)	104,71 (85,28;121,36)	105,75 (102,22;115,83)	111,15 (94,96;119,61)
	O	81,24 (76,09;88,72)	83,01 (71,19;97,19)	83,35 (77,51;87,13) ***↓	96,64 (84,11;100,68) **↓	103,22 (102,14;103,45)* **↓	111,25 (94,36;119,39)
Большой радиус, мкм	K	12,66 (11,70;13,83)	11,85 (11,06;12,69)	13,04 (12,04;13,96)	13,21 (12,00;14,22)	14,21 (13,61;15,86)	14,78 (13,91;16,44)
	O	11,57 (11,12;12,63)	11,72 (10,87;12,97)	10,36 (9,02;12,38) **↓	12,95 (11,64;14,13)	13,82 (12,52;15,26)	14,94 (12,29;21,21)
Малый радиус, мкм	K	9,26 (8,51;9,91)	9,26 (8,63;10,03)	9,33 (8,68;10,13)	10,05 (8,97;11,03)	10,54 (9,87;11,64)	11,31 (10,59;12,22)
	O	9,04 (8,47;9,66)	9,04 (8,34;9,82)	7,85 (7,47;8,59) ***↓	9,61 (8,93;10,32) *↓	9,48 (8,75;10,37) ***↓	11,23 (9,55;14,08)
Фактор элонгации	K	1,39 (1,27;1,52)	1,26 (1,19;1,38)	1,45 (1,27;1,59)	1,31 (1,18;1,45)	1,33 (1,21;1,45)	1,31 (1,20;1,47)
	O	1,33 (1,22;1,46)	1,30 (1,17;1,40)	1,31 (1,17;1,48)	1,35 (1,22;1,46)	1,42 (1,30;1,61) ***↑	1,34 (1,09;2,13)
Периметр , мкм	K	36,62 (34,33;38,77)	34,48 (32,38;37,11)	36,97 (35,05;39,24)	38,26 (34,84;41,75)	42,08 (39,81;46,42)	43,70 (40,69;46,68)
	O	34,14 (32,51;35,76)	32,90 (31,42;35,83) ***↓	32,51 (29,66;34,91) ***↓	37,25 (34,56;39,69)	40,39 (40,10;40,65) ***↓	43,84 (37,33;53,08)
Форм- фактор	K	0,86 (0,82;0,89)	0,91 (0,87;0,93)	0,87 (0,82;0,90)	0,89 (0,85;0,92)	0,85 (0,79;0,89)	0,89 (0,85;0,92)
	O	0,89 (0,86;0,92)	0,89 (0,85;0,91) ***↓	0,88 (0,83;0,90)	0,90 (0,86;0,91)	0,81 (0,77;0,87) ***↓	0,88 (0,73;0,95)

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$ при сравнении с контролем

При анализе размеров и формы ядер нейронов крупноклеточного слоя установлено, что у животных опытной группы на 2-е сутки после перерезки общего желчного протока не выявляется значительных изменений.

На 5-е сутки после перерезки ОЖП происходит уменьшение большого диаметра ядер на 4,6 % ($p<0,01$), малого радиуса – на 3,4 % ($p<0,05$), периметра – на 4,2 % ($p<0,01$). На 10-е сутки достоверно уменьшается площадь ядер на 1,5 % ($p<0,001$), малый радиус – на 1,2 % ($p<0,001$), большой радиус – на 0,3 % ($p<0,001$), периметр – на 1,7 % ($p<0,001$). На 20-е сутки уменьшена площадь ядра на 7,0 % ($p<0,05$), малый радиус – на 7,91 % ($p<0,01$), форм-фактор – на 4,4 % ($p<0,01$), а фактор элонгации увеличен на 1,6 % ($p<0,05$). ЯЦО этих нейронов у опытных животных увеличено на 10-е сутки после перерезки общего желчного протока на 12,2 %, на 20-е сутки – на 33,3 %, на 45 суток – на 12,7 %. Через 45-е и 90-е сутки после перевязки ОЖП в морфометрических параметрах ядер нейронов крупноклеточного слоя поясной коры не наблюдается достоверных изменений (табл. 4).

Табл. 4. Показатели размеров и формы ядра нейронов крупноклеточного слоя поясной коры, окраска по методу Ниссля (Ме (LQ; UQ))

Параметры		2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Площадь, мкм ²	К	54,23 (50,95;58,25)	61,45 (53,63;71,40)	63,20 (55,92;69,33)	66,21 (57,19;75,59)	68,45 (57,26;80,43)	69,94 (60,91;78,70)
	О	53,92 (47,12;58,75)	54,79 (48,19;68,69)	62,27 (53,29;82,41) ***↓	61,60 (52,08;70,44) *↓	69,19 (68,68;69,64)	69,68 (60,91;78,27)
Большой радиус, мкм	К	10,01 (9,15;11,00)	9,95 (9,26;10,67)	10,36 (9,02;12,35)	10,32 (9,34;10,83)	10,71 (9,61;11,76)	12,03 (11,18;13,22)
	О	9,24 (8,50;9,75)	9,49 (8,72;10,49)** ↓	10,33 (9,66;11,49) ***↓	9,91 (9,02;11,01)↓	10,93 (10,45;11,75)	12,39 (9,56;16,73)
Малый радиус, мкм	К	7,70 (6,93;8,67)	7,97 (7,27;8,66)	7,94 (7,32;8,57)	8,45 (7,48;9,12)	8,25 (7,43;9,05)	9,63 (9,16;10,43)
	О	7,42 (6,91;7,85)	7,70 (6,91;8,52) *↓	7,84 (7,43;8,59) ***↓	7,91 (7,36;8,41)**↓	8,36 (8,25;9,05)	9,60 (7,70;12,18)
Фактор элонгации	К	1,27 (1,17;1,40)	1,24 (1,14;1,35)	1,23 (1,15;1,37)	1,22 (1,11;1,32)	1,27 (1,19;1,41)	1,21 (1,14;1,31)
	О	1,24 (1,15;1,32)	1,22 (1,13;1,36)	1,31 (1,17;1,48)	1,24 (1,18;1,38)*↑	1,22 (1,15;1,34)	1,25 (1,03;1,96)
Периметр, мкм	К	29,55 (27,27;31,83)	29,63 (27,51;32,02)	30,57 (27,34;34,67)	30,57 (28,94;32,41)	31,68 (28,67;34,53)	32,90 (29,52;36,83)
	О	27,77 (26,15;28,75)	28,38 (26,46;31,22) **↓	30,04 (28,47;31,84)* **↓	30,55 (27,22;32,63)	31,63 (30,79;32,31)	32,96 (29,52;36,83)
Форм- фактор	К	0,88 (0,83;0,91)	0,89 (0,85;0,92)	0,87 (0,81;0,91)	0,90 (0,85;0,92)	0,87 (0,82;0,91)	0,88 (0,81;0,90)
	О	0,89 (0,83;0,92)	0,89 (0,84;0,92)	0,87 (0,83;0,90)	0,86 (0,80;0,91)**↓	0,88 (0,84;0,91)	0,86 (0,59;0,94)
ЯЦО	К	1,41 (1,27;1,65)	1,91 (1,64;2,40)	1,80 (1,26;2,20)	1,59 (1,40;1,95)	1,81 (1,38; 2,41)	1,74 (1,58;1,93)
	О	1,33 (1,22;1,43)	2,04 (1,54;2,61)	2,02 (1,79;2,28) *↑	2,12 (1,52;2,72) ***↑	2,04 (1,94;2,14) *↑	1,70 (1,58;1,84)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ при сравнении с контролем того же срока

Таким образом, наибольшие изменения в нейронах крупноклеточного слоя поясной коры наблюдаются, как и в нейронах мелкоклеточного слоя, через 10 и 20 суток после перерезки ОЖП, на максимуме холестаза при этом способе его моделирования у крыс. При этом происходит значительное снижение числа нейронов (особенно с 20-х суток), уменьшение площади перикарионов нейронов и их ядер, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения. Подобные изменения ЯЦО были получены ранее в нейронах пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа крыс при моделировании хронической алкогольной интоксикации [11]. Известно, что гиппокамп и поясная кора относятся к более старым структурам коры головного мозга (аллокортекс).

Заключение. На пике холестаза (на 10–20-е сутки после перевязки/перерезки общего жёлчного протока) у крыс уменьшается число нейронов на единицу площади мелкоклеточного и крупноклеточного слоев поясной коры. После перерезки ОЖП по мере развития холестаза в поясной коре происходит постепенное уменьшение размеров нейронов и их ядер, которое достигает максимума на 5-е, 10-е, 20-е сутки в мелкоклеточном слое и на 10-е, 20-е, 45-е сутки в крупноклеточном слое. Следовательно, нейроны мелкоклеточного слоя быстрее реагируют на холестаз, а сохранившиеся нейроны быстрее восстанавливаются. По мере уменьшения площади перикарионов нейронов и их ядер в мелкоклеточном слое, их форма вытягивается (возрастает фактор элонгации). В дальнейшем через 45–90 суток после перерезки ОЖП происходит постепенная нормализация размеров и формы нейронов в мелкоклеточном слое поясной коры, а в крупноклеточном – через 90 суток.

Литература:

- [1] Банина В. В., Быкова В. Л. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
- [2] Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных. Минск : Ин-т подготовка научных кадров НАН Беларуси, 2008. 160 с.
- [3] Вахрушев Я.М., Хохлачева Н.А. Желчнокаменная болезнь: эпидемиология, факторы риска, особенности клинического течения, профилактика // Архив внутренней медицины. 2016. Т. 6, № 3. С.30–35.
- [4] Емельянчик С.В. Закономерности морфофункциональных изменений нейронов мозга крысы при нарушениях циркуляции желчи: Автореф. дис. ...доктора биол. наук. Минск : УО «Белорусский государственный медицинский университет», 2021. 43 с.
- [5] Зиматкин С.М., Емельянчик С.В. Нейроны мозга при нарушениях циркуляции желчи. Гродно : ГрГМУ, 2021. 368 с.
- [6] Кизюкевич Л. С. Причины развития полиорганной недостаточности при хирургической патологии желчевыводящих путей // Вести Национальной академии наук Беларуси. Сер. мед. наук. 2005. № 2. С. 118–121.
- [7] Кизюкевич Л.С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазе. Гр.: ГрГМУ, 2005. 239 с.
- [8] Мажирин К.Г., Первушина О.Н., Федоров А.А. и др. Нейровизуализация и феномен морального выбора // Успехи физиологических наук. 2021, Т. 52, № 1. С. 16–30
- [9] Омельченко В.П., Демидова А.А. Информатика, медицинская информатика, статистика. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 608 с.
- [10] Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М. : Медиа Сфера, 2003. 312 с.
- [11] Смирнов А.В. и др. Морфологические преобразования в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа крыс при моделировании хронической алкогольной интоксикации и фармакологической коррекции соединением нейроглутам // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2019. №4. С.8–13.
- [12] Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes : text with EEA relevance 20.10.2010. Strasbourg : Official Journal of the European Union, 2010. 46 p.
- [13] Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press, 2007. 448 p.

T. V. KLIMUT¹, A. V. ZAERKO¹, S. V. EMELYANCHIK², S. M. ZIMATKIN¹

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE NEURONS OF THE RAT CINGULATE CORTEX DURING CHOLESTASIS

¹ Educational institution "Grodno State Medical University", Grodno, Republic of Belarus

² Educational institution "Yanka Kupala Grodno State University", Grodno, Republic of Belarus

Summary

It has been established that at the peak of cholestasis (10–20 days after ligation/transection of the common bile duct (CBD) in rats, the number of neurons per unit area of the parvocellular and magnopyramidal layers of the cingulate cortex decreases. As cholestasis develops in the cingulate cortex, a gradual decrease in the size of neurons and their nuclei occurs, which reaches a maximum on days 5, 10, 20 in the small cell layer and on days 10, 20, 45 in the large cell layer. At the same time, the pericaryons of neurons are elongated and their sphericity decreases. Consequently, neurons of the small cell layer respond more quickly to cholestasis, and the remaining neurons recover more quickly. Subsequently, 45–90 days after CBD transection, a gradual normalization of the size and shape of neurons occurs in both layers of the cingulate cortex under study.

Key words: cingulate cortex, magnocellular layer, parvocellular layer, brain, cholestasis.

О. В.ТИТКО¹, Н. П.КАНУННИКОВА^{1,2}, Д. С.СЕМЕНОВИЧ³

ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА И ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

¹ Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», Гродно, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», Гродно, Республика Беларусь

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Были исследованы показатели окислительного стресса и энергетического обмена в крови и больших полушариях мозга крыс в модели нейродегенеративной патологии, осуществляемой посредством введения животным 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК), а также протекторные свойства производных пантотеновой кислоты. Установлено, что введение 3-НПК приводит к развитию окислительного стресса не только в головном мозге, но и на уровне всего организма. При этом происходят значительные изменения и энергетического метаболизма, и пентозофосфатного пути в больших полушариях мозга. Пантенол и пантетин, вводимые на фоне действия 3-НПК, проявляют защитные эффекты в отношении показателей окислительного стресса и энергетического метаболизма не только в больших полушариях мозга, но и возвращают показатели окислительного стресса и карбонилирования белков в плазме крови к значениям контрольной группы. ГПК действует слабее на вышеуказанные отклонения как в крови, так и в мозге.

Ключевые слова: окислительный стресс, энергетический метаболизм, большие полушария мозга, 3-нитропропионовая кислота, нейродегенеративные заболевания.

Введение. Нейродегенеративные заболевания, представляющие серьезную проблему здравоохранения в наше время, характеризуются прогрессирующим повреждением нервных клеток и гибелью нейронов, что приводит к нарушениям двигательной и/или когнитивной функции [1]. Сложный патогенез нейродегенеративных заболеваний остается в значительной степени неизвестным, однако все больше данных свидетельствует о том, что продукты свободнорадикального окисления могут играть решающую роль в иницировании процессов нейродегенерации [2]. Хотя активные формы кислорода (АФК) и/или активные формы азота (АФА) могут и не быть пусковым фактором развития нейродегенеративных заболеваний, они могут усугубить прогрессирование заболевания за счет окислительного повреждения и взаимодействия с митохондриями [2, 3]. В физиологических условиях уровень АФК, генерируемых в митохондриях, поддерживается на относительно постоянном уровне благодаря эндогенным антиоксидантам [4].

Развитие ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона (БХ), связано с мисфолдингом и накоплением нерастворимых комплексов таких белков в виде телец Леви, хантингтина и др. [1]. Агрегация этих модифицированных белков, в свою очередь, может вызвать воспалительную реакцию в мозге, которая индуцирует образование АФК и нарушения энергетического метаболизма [4–6]. У пациентов с БХ отмечается снижение потребления глюкозы и повышение уровня лактата, а также прямое ингибирующее воздействие на дыхательный комплекс II [7, 8].

Одним из способов моделирования метаболических нарушений, характерных для нейродегенеративной патологии, является введение животным 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК), которая вызывает избирательную дегенерацию нейронов в стриатуме и развитие симптомов, характерных для БХ [9]. Есть сведения, что ее нейротоксическое действие связано с необратимым ковалентным связыванием с субъединицей 70 кДа сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и угнетением

активности фермента [10]. Системное введение НПК крысам снижает содержание восстановленного глутатиона и увеличивает продукцию гидроксильных радикалов и нитротирозина, а также способствует образованию карбонилированных белков в пораженном полосатом теле мозга [11, 12]. Как показано нами ранее, введение производных пантотеновой кислоты, уменьшает нарушения окислительно-восстановительного потенциала системы глутатиона в мозге при окислительном стрессе [12, 13].

Цель работы – изучение показателей окислительного стресса и энергетического метаболизма в крови и мозге при моделировании нейродегенерации на крысах. В задачу работы входила оценка нейропротекторных свойств производных пантотеновой кислоты в данной модели.

Материалы и методы исследования. Были использованы крысы-самки линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 150–180 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Все эксперименты с лабораторными животными выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях, составленными на основании рекомендаций и требований «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Крысы были разделены на 5 экспериментальных групп ($n=7$). Животным первой группы вводили воду (контроль). Животные второй, третьей, четвертой и пятой групп получали 3-НПК. Препарат вводили в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг внутривентрикулярно. Крысам третьей группы на фоне 3-НПК вводили пантенол (ПЛ), четвертой группе – пантетин (ПТ), а животным пятой группы на фоне 3-НПК вводили гомопантотенат кальция (ГПК). Препараты Д-пантенол, Д-пантетин и гомопантотенат кальция вводили внутривентрикулярно в дозе 200 мг/кг (0,5 мл) в течение 14 дней. После декапитации крыс собирали кровь в присутствии гепарина и извлекали мозг, из которого выделяли большие полушария.

Содержание свободнорадикальных продуктов, реагирующих с N,N-диметил-п-фенилендиамином (ДФАРС), в плазме крови оценивали по методу [14]. Общую антиоксидантную активность плазмы крови (ОАА) определяли по методу Стокса [15]. Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали спектрофотометрически по содержанию альдегидфенилгидразонов (регистрация при 274 нм) и кетондинитрофенилгидразонов (регистрация при 363 нм) белков в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [16].

Содержание тиобарбитурат-реагирующих соединений (ТБКРС) в мозге определяли по методу [17]. При этом в одной аликвоте супернатанта после немедленного торможения ПОЛ путем добавления бутилгидрокситолуола и ТБК-реактанта определяли базальный уровень ТБКРС для оценки исходного уровня карбонильных продуктов ПОЛ, в другой – после 30 минут инкубации при 37° определяли спонтанный уровень ТБКРС для оценки наработки карбонильных продуктов ПОЛ, а в третьей – после добавления активатора ПОЛ – Fe-аскорбат-индуцированный уровень ПОЛ.

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [18], 2-оксоглутаратдегидрогеназы (2-ОГДГ) [19] и цитохром С-оксидазы [20] в ткани структур мозга определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве акцептора электронов феррицианид калия. Активность аконитазы измеряли ферментативным методом [21].

Для оценки интенсивности метаболизма по пентозофосфатному пути определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ) спектрофотометрически с использованием НАДФ [22].

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного нами эксперимента установлено, что введение 3-нитропропионовой кислоты приводило к активации процессов свободнорадикального окисления липидов в плазме крови, о чем свидетельствует повышение содержания ДФАРС в плазме на 53 % ($p<0,05$) (таблица 1). Введение ПЛ или ГПК на фоне 3-НПК приводило к возвращению уровня ДФАРС до их содержания в контрольной группе, тогда как эффект ПТ на этот показатель был значительно слабее. В плазме крови 3-НПК вызывал также изменения карбонилирования белков. Так, отмечалось уменьшение содержания карбонильных форм белков: альдегидфенилгидразонов на 12 % ($p<0,05$) и кетондинитрофенилгидразонов практически в 2 раза ($p<0,05$). Введение на этом фоне ПЛ, ПТ или ГПК приводило к возвращению уровня альдегидфенилгидразонов практически до значений в контроле, тогда как содержание кетондинитрофенилгидразонов оставалось сниженным при действии ПЛ, практически возвращалось к контрольным значениям при действии ГПК, но оказалось выше контрольных значений на фоне введения ПТ.

Табл. 1. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на окислительную модификацию белков (ОМБ) и уровень ДФАРС в плазме крови ($M \pm SD$)

Группы	Альдегидфенилгидразоны, ед.опт.пл./мл плазмы	Кетондинитрофенилгидразон ы, ед.опт.пл./мл плазмы	ДФАРС, мкмоль/мл плазмы
Контроль	50,98 $\pm$ 1,75	3,07 $\pm$ 0,14	102,4 $\pm$ 8,62
НПК	44,64 $\pm$ 1,29*	1,70 $\pm$ 0,11*	156,9 $\pm$ 11,15*
НПК+ПЛ	45,43 $\pm$ 1,05*	1,49 $\pm$ 0,18*	97,90 $\pm$ 6,93#
НПК+ПТ	48,81 $\pm$ 1,11	4,21 $\pm$ 0,40*#	137,7 $\pm$ 13,68*#
НПК + ГПК	48,46 $\pm$ 0,85	2,65 $\pm$ 0,06#	113,5 $\pm$ 9,35#

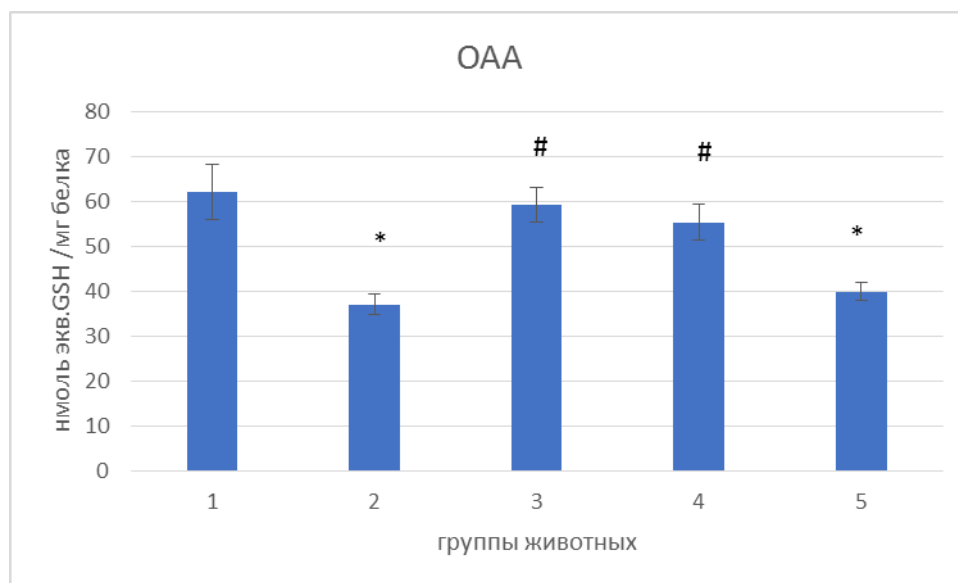
Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК

Выраженный сдвиг окислительно-восстановительного баланса на фоне введения 3-НПК происходил также в больших полушариях мозга крыс. Показателем этого является повышение базального (на 61 %), спонтанного (на 54 %) и железо-аскорбат-индуцируемого (на 21 %) содержания ТБКРС в этой структуре (таблица 2). ПЛ и ПТ способствовали возвращению вышеуказанных показателей до значений в контрольной группе, тогда как влияние ГПК по нормализации перекисного окисления липидов в мозге оказалось более слабым. Активация ПОЛ при действии 3-НПК сопровождалась почти двукратным снижением общей антиоксидантной активности в больших полушариях мозга (рисунок). ПЛ и ПТ, но не ГПК приводили к восстановлению антиоксидантной активности.

Табл. 2. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на содержание ТБК-реагирующих соединений (ТБКРС, нмоль/мг белка) в больших полушариях мозга ($M \pm SD$)

Группы	Базальный уровень ТБКРС	Спонтанный уровень ТБКРС	Fe(II)/аскорбат- индуцированный уровень ТБКРС
Контроль	1,22 $\pm$ 0,12	4,21 $\pm$ 0,24	10,82 $\pm$ 0,42
НПК	1,97 $\pm$ 0,08*	6,48 $\pm$ 0,32*	13,12 $\pm$ 0,56*
НПК+ПЛ	1,32 $\pm$ 0,10#	4,76 $\pm$ 0,34#	11,75 $\pm$ 0,51#
НПК+ПТ	1,40 $\pm$ 0,11#	4,45 $\pm$ 0,32#	11,83 $\pm$ 0,50#
НПК + ГПК	1,77 $\pm$ 0,09*	5,65 $\pm$ 0,30*#	12,88 $\pm$ 0,78*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК.

**Рис.** Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на общую антиоксидантную активность (ОАА) в плазме крови. Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК. Группы : 1 – контроль, 2 – НПК, 3 – НПК+ПЛ, 4 – НПК+ПТ, 5 – НПК + ГПК.

Изучение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования в митохондриях больших полушарий мозга при введении 3-НПК показало значительное снижение активности СДГ (на 48 %) (таблица 3), что подтверждает данные литературы о выраженном угнетающем действии 3-НПК на этот фермент [10]. Учитывая то, что при этом наблюдаются также значительные нарушения карбонилирования белков (см. таблицу 1), можно предположить, что такое угнетение активности СДГ связано с мисфолдингом фермента, так как молекула СДГ состоит из нескольких субъединиц, для правильной сборки которых в несколько этапов требуется ряд белков [23].

Нами установлено, что при этом произошло также выраженное угнетение активности ОГДГ (на 44 %), но активация аконитазы (почти в 1,5 раза) в этой структуре мозга. Одновременно произошло угнетение активности цитохромоксидазы практически в 2 раза, что, очевидно, свидетельствует о выраженном метаболическом дисбалансе в процессах образования энергии под влиянием 3-НПК. Введение ПЛ оказалось не в состоянии снять ингибирующее действие нейротоксиканта на активность СДГ, однако ослабило его эффекты на активность аконитазы, оксоглутаратдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Аналогичными были эффекты ПТ. Введение ГПК несколько более выраженно способствовало восстановлению активности аконитазы и оксоглутаратдегидрогеназы.

Табл. 3. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на активность ферментов энергетического метаболизма в больших полушариях мозга (M±SD)

Группы	Аконитаза, нмоль/мин/мг белка	Оксоглутаратдегидро- геназа, нмоль/мин/мг белка	СДГ, нмоль/мин/мг белка	Цитохром С- оксидазы, нмоль/мин/мг белка
Контроль	44,71±1,56	7,85±1,17	67,68±5,16	5,43 ± 0,19
НПК	66,80±4,27*	4,34±0,76*	35,48±4,50*	2,76 ± 0,17*
НПК+ПЛ	51,99±2,01*#	5,59±0,35	26,87±1,59*	3,71± 0,15*#
НПК+ПТ	70,05±2,29*	6,82±0,71#	27,26±1,80*	3,18 ± 0,25*
НПК + ГПК	40,87±1,73#	7,60±0,66#	36,37±1,96*	3,33± 0,12*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК

Изменения процессов образования энергии в больших полушариях мозга при действии 3-НПК сопровождались повышением активности и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (на 13 %), и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (на 15 %), что свидетельствует об усилении метаболизма по пентозофосфатному пути (таблица 4). Введение ПЛ и ПТ приводило к возвращению активности обоих ферментов к значениям таковых в контрольной группе, тогда как ГПК практически не оказал влияния на эти показатели.

Табл. 4. Влияние 3-НПК и производных пантотеновой кислоты на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-Ф-ДГ) и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы (6-Ф-Гл-ДГ) в больших полушариях мозга (M±SD)

Группы	Гл-6-Ф-ДГ нмоль НАДФН/мин/мг белка	6-Ф-Гл-ДГ нмоль НАДФН/мин/мг белка
Контроль	43,3±0,8	48,1±0,9
НПК	48,8±0,6*	55,2±0,8*
НПК+ПЛ	42,9±1,0#	49,8±0,5#
НПК+ПТ	43,9±0,8#	48,7±1,0#
НПК + ГПК	46,8±1,5*	53,8±0,7*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, # – $p < 0,05$ по отношению к 3-НПК.

Заключение. Моделирование нейродегенеративной патологии посредством введения 3-НПК сопровождается выраженной активацией образования продуктов перекисного окисления липидов и снижением восстановительного потенциала и в крови, и в больших полушариях мозга, что является характерной чертой метаболических нарушений при многих нейродегенеративных заболеваниях.

Пантенол и пантетин, вводимые на фоне действия 3-нитропропионовой кислоты, проявляют нейропротекторное действие в отношении процессов липоперекисления и энергообеспечения в больших полушариях мозга, а также возвращают показатели окислительного стресса и карбонилирования в плазме крови к значениям контрольной группы. ГПК действует слабее на выраженность окислительного стресса как в крови, так и в мозге, а также проявляет меньшую способность на восстановление процессов энергообеспечения в мозге, что, по-видимому, обусловлено

тем, что ГПК может нарушать биосинтез КоА, тогда как пантенол и пантетин являются его предшественниками.

Литература:

- [1] Пономарев В.В. Нейродегенеративные заболевания СПб.: Фолиант, 2013. 200 с.
- [2] Dias V., Junn E., Mouradian M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease // J. Parkinson's Dis. 2013. vol. 3. p. 461–491.
- [3] Rego A. C., Oliveira C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases // Neurochemical Research. 2003. vol. 28. p. 1563–1574.
- [4] Zuo L. et al. Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly // Acta Physiologica. 2015. vol. 214. p. 329–348.
- [5] Lin M. T., Beal M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // Nature. 2006. vol. 443. p. 787–795.
- [6] Liu Z. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications [Electronic resource] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785371>. – Data of access: 18.05.2018.
- [7] Mochel F., Haller R. G. Energy deficit in Huntington disease: why it matters // The Journal of Clinical Investigation. 2011. vol. 121. p. 493–499.
- [8] Covarrubias-Pinto A., Moll P., Solis-Maldonado M. Beyond the redox imbalance: oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease // Free Radical Biology and Medicine. 2015. Vol. 89. p. 1085–1096.
- [9] Kumar P. et al. 3-Nitropropionic acid induced neurotoxicity: An animal model for Huntington's disease // J. Cell Tissue Res. 2007. Vol. 7, № 1. P. 853–860.
- [10] Huang L. S. et al. 3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281, № 9. P. 5965–5972.
- [11] Kumar P. et al. Protective effect of sesamol against 3-nitropropionic acid-induced cognitive dysfunction and altered glutathione redox balance in rats // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2010. Vol. 107, № 1. P. 577–582.
- [12] Семенович Д. С. Система глутатиона и S-глутатионилирование белков в базальных ганглиях головного мозга крыс при действии митохондриальных нейротоксинов и производных пантотеновой кислоты // Новости медико-биологических наук. 2019. Т. 19, № 2. С. 47–52.
- [13] Семенович Д. С. и др. Эффект модуляторов системы биосинтеза кофермента А на проявления метаболического стресса и систему глутатиона в ЦНС при алюминиевом нейротоксикозе // Нейрохимия. 2023. Т. 40, № 1. С. 48–58.
- [14] Verde V. et al. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma // Free Radical Research. 2002. Vol. 36, № 8. P. 869–873.
- [15] Stocks J. et al. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids // Clinical Science and Molecular Medicine. 1974. Vol. 47. P. 215–222.
- [16] Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Методические рекомендации под ред. В. Х. Хавинсона. СПб, 2000. 103 с.
- [17] Durfinova M. et al. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in Rat Brain Tissues // Chem. Pap. 2007. Vol. 61, № 4. P. 321–325.
- [18] Reisch A. S., Elpeleg O. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc // Methods Cell Biol. 2007. Vol. 80. P. 199–222.
- [19] Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: Лаборатория знаний, 2013. 132 с.
- [20] Рогожин В. В. Практикум по биохимии.: СПб.: Изд. Лань, 2013. С. 338–339.
- [21] Quirós, P. M. Determination of Aconitase Activity: A Substrate of the Mitochondrial Ion Protease // Methods in Molecular Biology. 2018. Vol. 1731. P. 49–56.
- [22] Ninfali P., Alnigi A., Pompella A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity is higher in the olfactory bulb than in other brain regions // Brain Res. 1997. Vol. 744. P. 138–142.
- [23] Moosavi B., et al. The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics // Cell Mol. Life Sci. 2019 Vol. 76, № 20 P. 4023–4042.

O. V. TITKO¹, N. P. KANUNNIKOVA^{1,2}, D. S. SEMENOVICH³

**CHANGES IN PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM IN RATS
IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE AND THE EFFECT OF
PANTOTHENIC ACID DERIVATIVES**

¹ *State Enterprise "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus", Grodno, Republic of Belarus*

² *Educational institution "Yanka Kupala Grodno State University", Grodno, Republic of Belarus*

³ *Scientific Research Institute of Physico-Chemical Biology named after A. N. Belozersky Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russian Federation*

Summary

Changes in parameters of oxidative stress and energy metabolism in the blood and brain hemispheres of rats were studied in a model of neurodegenerative pathology carried out by administering 3-nitropropionic acid (3-NPA) to animals, as well as the protective properties of pantothenic acid derivatives. It has been shown that the administration of 3-NPA leads to the development of oxidative stress not only in the brain, but also at the level of the whole organism. At the same time, significant changes occur in both energy metabolism and the pentose phosphate pathway in the brain hemispheres. Panthenol and pantethine, administered against the background of the action of 3-NPA, exhibit protective effects on parameters of oxidative stress and energy metabolism not only in the brain hemispheres, but also return parameters of oxidative stress and protein carbonylation in blood plasma to the values of the control group. Hopanthenic acid has a weaker effect on the above violations both in the blood and in the brain.

Key words: oxidative stress, energy metabolism, brain hemispheres, 3-nitropropionic acid, neurodegenerative diseases.

А. А. ЧИРКИН, П. Ю. ПИНЧУК, М. В. ВИШНЕВСКАЯ,
О. М. БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М.
Машерова», Витебск, Республика Беларусь

В статье представлены данные о молекулярно-структурном сходстве 20-и ферментов, контролирующих содержание глюкозы, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина в сыворотке крови человека, лабораторной крысы и в гемолимфе легочного пресноводного моллюска *Biomphalaria glabrata* в рамках поиска простых и доступных организмов, которых можно использовать для изучения особенностей обмена веществ при воздействии патологических факторов. Опыты с введением глюкозы показали, что прудовики обыкновенные (*Lymnaea stagnalis*) и катушки роговые (*Planorbarius corneus*), являющиеся ближайшими родственниками *Biomphalaria glabrata*, в паре могут служить возможными организмами для оценки состояния метаболизма при физиологической стимуляции обмена веществ введением глюкозы в концентрациях 0,05–0,5 %, нарушении инсулиновой регуляции обмена углеводов введением стрептозотоцина в дозах 35–100 мкг/г и моделировании токсических эффектов этанола в диапазоне концентраций 0,1–5,0 %.

Ключевые слова: циркулирующие молекулы, человек, крыса, легочные пресноводные моллюски, нарушения обмена веществ, стрептозотозин, этанол.

Введение. До настоящего времени проводится анализ биохимических процессов у представителей различных биологических царств с целью анализа состояния обмена веществ и обоснования возможности использования их в качестве индикаторных организмов. Так, в опубликованной работе текущего года установлены молекулярные механизмы поддержания гомеостаза ионов цинка у бактерий, дрожжей, растений и человека [1]. Для биомедицинских исследований наиболее часто используются высшие млекопитающие [2], обладающие высоким сходством геномов с геномом человека – обезьяны [3], свиньи [4], крысы [5], мыши [6] и др. Приведем примеры использования высших млекопитающих для моделирования основных механизмов, вовлеченных в развитие наиболее часто встречающегося у человека метаболического синдрома (МС): изменения диеты, изменения геномов, прием лекарств. При моделировании метаболического синдрома применяют 4 типа диет. Диета с высоким содержанием фруктозы препятствует гликолитическому пути, поскольку исключается стадия контроля скорости гликолиза – превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат. Фосфофруктокиназа действует как негативный регулятор метаболизма глюкозы и позволяет фруктозе непрерывно вступать в гликолитический путь с образованием пирувата, лактата, глицерина и ацилглицеринов. При рационе с высоким содержанием углеводов доступно большое количество глюкозы, которая расщепляется посредством гликолиза, превращается в гликоген и ведет к повышенной выработке инсулина. Этот гормон в жировой ткани способствует синтезу жирных кислот. Потребление диеты с высоким содержанием сахарозы из-за ее распада на молекулы фруктозы и глюкозы ведет к специфическим механизмам действия избытка глюкозы или фруктозы. Богатая триглицеридами диета способствует липолизу и выбросу в кровь глицерина и жирных кислот. Однако жирные кислоты, высвобождаемые в ходе липолиза, реэстерифицируются с образованием триглицеридов. Перепроизводство триглицеридов в результате чрезмерного потребления питательных веществ может вызвать их накопление в печени, что в дальнейшем приведет к резистентности гепатоцитов к инсулину. На втором месте находятся генетические модели метаболического синдрома: мыши с дефицитом лептина (ob/ob), мыши с дефицитом рецептора лептина (db/db), крысы Zucker с ожирением (ZF), крысы Zucker с диабетом и ожирением (ZDF), крысы DS/obese, крысы Goto-Kakizaki (GK), мыши POUND™. На третье место можно поставить лекарственные модели МС. Глюкокортикоиды вызывают МС посредством нескольких механизмов: 1) стимулируют дифференцировку преадипоцитов в зрелые

адипоциты; 2) усиливают липолиз с высвобождением свободных жирных кислот; 3) активируют протеолиз в мышцах, увеличивая количество свободных аминокислот, а индуцированная аминокислотами активация комплекса рапамицина-1 (mTORC1) у млекопитающих вызывает фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS-1), что и приводит к возникновению резистентности к инсулину; 4) способствуют глюконеогенезу в печени и вызывают гипергликемию и 5) неспецифическое связывание глюкокортикоидов с его рецептором в почках вызывает увеличение задержки натрия, экскреции калия, задержки воды и объема плазмы одновременно с повышением артериального давления. Прием антипсихотических препаратов может вести к развитию МС, о чем свидетельствуют увеличение массы тела, увеличение висцерального жира, нарушение толерантности к глюкозе и резистентность к инсулину в исследованиях на животных [7]. Вышеизложенное показывает, что даже у генетически близких к человеку экспериментальных животных не удастся воспроизвести все метаболические проявления МС.

В сочетании с заметным развитием инструментов редактирования генов стволовые клетки и органоиды человека предоставляют современные системы для изучения механизмов метаболических заболеваний. С момента создания технологии эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК, hESCs) и технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК, iPSC) из этих плюрипотентных стволовых клеток человека получают различные типы клеток, имеющих отношение к заболеванию, с помощью протоколов поэтапной дифференцировки, имитирующих органогенез *in vivo* [8]. За последнее десятилетие моделирование патологических процессов человека улучшилось благодаря технологии органоидов. Органоид определяется как трехмерная структура, полученная из стволовых клеток, клеток-предшественников и/или дифференцированных клеток, которые самоорганизуются посредством межклеточных взаимодействий для моделирования структуры и функции нативной ткани *in vitro*. Органоиды печени и органоиды жировой ткани, независимо от того, получены ли они из hPSC, здоровой ткани или пораженной ткани рассматриваются как платформа для изучения развития и прогрессирования проявлений метаболических заболеваний человека, а также потенциальных методов их терапии [9]. В последние годы были созданы органоиды почек свиньи из наивно-подобных эмбриональных стволовых клеток свиней (нЭСК). Полученные свиные органоиды имели трубчатую структуру и матричные компоненты. Органоиды свиньи экспрессировали почечные маркеры, включая AQP1 (проксимальные каналы), WT1 и PODO (подоциты) и CD31 (эндотелиальные клетки сосудов). Эти результаты подразумевают, что в органоидах развилось большинство типов почечных клеток и надклеточных структур, включая клубочки и проксимальные каналы [10, 11]. Общая проблема в работе с органами на чипах заключается в изоляции их во время тестирования. Кроме того, эти технологии требуют специального оборудования и подготовленного персонала.

Следующий уровень моделирования патологических процессов определяется культивированием клеток *in vitro*. Для этого исследуют функциональное состояние клеток с помощью омиксных наук. Библиотека метаболических задач, которые может выполнять клетка, «встроена» в ее геном, а способность модулировать активность этих задач позволяет клетке адаптироваться к изменяющейся среде. Концепция «метаболических задач» используется для оценки качества и возможностей метаболических моделей в масштабе генома [12]. Посттрансляционная модификация белка (ПТМ) - термин, обозначающий биохимическую модификацию определенных аминокислотных остатков в белках-мишенях, что значительно увеличивает функциональное разнообразие протеома. На основе ПТМ изучают распространенные метаболические заболевания и их последствия, включая диабет, ожирение, жировые заболевания печени, гиперлипидемию и атеросклероз, нарушения эпигенетических механизмов регуляции, а также оценивают эффективность фармакотерапии [13]. На всех этапах моделирования метаболизма *in silico* обычно используются различные алгоритмы машинного обучения и анализа результатов [14].

Таким образом, моделирование изменений метаболизма на уровнях целого организма → изолированных органов и органоидов → клеточных культур и машинного обучения являются важными этапами биомедицинских исследований. Однако актуальным остается поиск простейших организмов, которые занимают промежуточное положение между млекопитающими и культурами клеток [15]. На протяжении последнего десятилетия проводится сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ у двух видов легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по типу транспорта кислорода – прудовики обыкновенные *Lymnaea stagnalis* (транспорт кислорода с помощью медь содержащего гемоцианина) и катушки роговые *Planorbis corneus* (транспорт кислорода с помощью железо содержащего гемоглобина). В предыдущих исследованиях была

проанализирована молекулярно-структурная гомология 16 ферментов гликолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути обмена углеводов человека, свиньи, лабораторной крысы и легочного пресноводного моллюска *Biomphalaria glabrata*. По сравнению с человеком обнаружено сходство аминокислотных последовательностей ферментов у лабораторных крыс в диапазоне 98,63–81,79 %, у свиней – 99,08–88,96 % и у моллюска – 74,22–37,31 %; по третичной структуре белков-ферментов – у лабораторных крыс в диапазоне 96,97–81,79 %, у свиней – 99,08–89,94 % и у моллюска – 74,38–36,70 %. Полученные данные демонстрируют возможность использования в биомедицинских исследованиях более простых животных [16, 17]. В отличие от *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*, которые являются наиболее распространенными и наиболее хорошо изученными моделями беспозвоночных, легочные пресноводные моллюски имеют относительно большую продолжительность жизни, что позволяет изучать возрастные изменения, затрагивающие генетические, молекулярные и клеточные механизмы; имеют существенное преимущество из-за отсутствия гисто-гематических барьеров, в частности, гематоэнцефалического, что позволяет прямо изучать молекулярные мишени для разработки инновационных терапевтических стратегий путем введения в среду обитания или гемолимфу потенциальных лекарственных средств. Более того, моллюски не имеют серьезных этических и экономических проблем, характерных для животных моделей, которые в настоящее время наиболее часто используются при доклинических исследованиях. Следует также отметить, что геномы ряда легочных пресноводных моллюсков секвенированы и аннотированы [2, 18–20].

Целью работы было использование легочных пресноводных моллюсков для изучения экспериментально вызванных нарушений обмена веществ.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на 250 особях прудовика обыкновенного и 250 особях катушки роговой. В каждой исследовательской подгруппе было от 8 до 10 моллюсков. Все животные были одинакового размерного класса от 3 до 4,5 сантиметров, массой от 3 до 6 граммов. Расчетный возраст такой группы составляет около 50 недель, при средней продолжительности жизни 2 года. Моллюсков помещали на 30 мин в ванночки с растворами глюкозы 0,05 %, 0,1 %, 0,15 %, 0,5 % (8 групп), а также в ванночки с растворами этанола 0,1%, 0,5% и 5% (6 групп). Биохимические показатели оценивали через 12 и 24 часа. В 9 группах исследовали влияние вводимого в ногу раствора стрептозотоцина в дозах 35,0, 80,0 и 100 мкг/г. Биохимические показатели оценивали через 24 и 48 часов [21]. Для изучения хронического действия этанола в эксперименте использовался легочной пресноводный моллюск прудовик обыкновенный в количестве 135 особей. Отобранных моллюсков, разделили на 3 группы по 9 моллюсков в группе: 1 группа – контроль, моллюски данной группы ничем не обрабатывались; 2 группа – моллюски, в течении 10 суток подвергались ежесуточной обработке 3 % этиловым спиртом в течении 30 минут; 3 группа – моллюски, в течении 20 суток подвергались ежесуточной обработке 3 % этиловым спиртом в течении 30 минут.

Срезы гепатопанкреаса окрашивали гематоксилин-эозином. В гемолимфе определяли содержание общего белка, глюкозы, мочевины, мочевой кислоты и холестерина, используя стандартные наборы реагентов фирмы НТПК «Анализ Х». Весь цифровой материал обработан методом параметрической статистики (t-критерий Стьюдента). Методами биоинформатики было изучено сходство молекулярно-структурной организации ферментов, участвующих в обмене глюкозы, этанола, мочевины, мочевой кислоты и холестерина [2].

Результаты и их обсуждение. Биоинформатический анализ, включающий сравнительный анализ аминокислотных последовательностей ферментов (AAS), нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов (NS) и сходство третичных структур ферментов (3D), показал, что для моллюска *Biomphalaria glabrata*, ближайшим родственником которого является катушка роговая, имеется средний уровень молекулярно-структурного сходства ферментов, а у лабораторных крыс высокий уровень молекулярно-структурного сходства ферментов, участвующих в обмене глюкозы, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина по сравнению с человеком (табл. 1). Это послужило основанием:

- 1) для использования легочных пресноводных моллюсков при изучении экспериментально вызванных нарушений обмена веществ;
- 2) в качестве контрольных биохимических показателей – определения содержания глюкозы, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина.

Табл. 1. Оценка сходства аминокислотных последовательностей белков, нуклеотидных последовательностей генов и третичных структур ферментов обмена веществ между человеком и модельными организмами

Фермент и его номер в классификации ферментов (КФ)	<i>Biomphalaria glabrata</i>			<i>Rattus norvegicus</i>		
	AAS	NS	3D	AAS	NS	3D
Обмен глюкозы						
Фосфоглюкомутаза, КФ 5.4.2.2.	69,1	57,9	50,4	83,4	69,2	66,5
Гексокиназа 3, КФ 2.7.1.1.	29,3	27,9	37,9	71,6	62,9	56,9
Глюкозо-6-фосфатаза, КФ 3.1.3.9.	53,0	49,7	38,8	93,8	84,4	86,8
Г-6-Ф-дегидрогеназа, КФ 1.1.1.49.	72,3	59,0	69,4	96,7	87,6	93,5
Обмен общего белка						
Катепсин А, КФ 3.4.16.5.	67,5	56,2	54,6	88,8	84,0	88,7
Катепсин В, КФ 3.4.22.1.	60,9	56,1	51,9	89,1	80,2	81,8
Катепсин С, КФ 3.4.14.1.	65,2	56,7	51,6	87,3	82,8	80,1
Катепсин D, КФ 3.4.23.5.	58,5	50,7	51,6	89,8	88,6	83,3
Катепсин F, КФ 3.4.22.41.	31,7	45,3	30,5	83,1	77,6	78,4
Катепсин L, КФ 3.4.22.15.	46,0	42,1	49,3	85,9	77,7	74,1
Катепсин O, КФ 3.4.22.42.	50,6	49,5	37,9	83,5	78,1	79,2
Катепсин X, КФ 3.4.18.1.	67,9	58,3	68,2	90,2	82,1	87,9
Обмен мочевой кислоты						
Ксантиноксидаза, КФ 1.17.3.2.	32,4	37,6	30,6	95,9	86,1	90,7
Обмен мочевины						
Карбамоилфосфатсинтетаза, КФ 6.3.4.16.	78,6	63,3	63,6	98,5	89,4	96,1
Аргининсукцинатсинтетаза, КФ 6.3.4.5.	79,6	63,3	70,1	99,0	89,7	97,6
Аргининсукцинатлиаза, КФ 4.3.2.1.	76,9	61,1	63,9	92,2	84,8	90,1
Аргиназа, КФ 3.5.3.1.	52,9	48,9	52,2	68,1	57,0	58,3
Обмен холестерина						
Ацетоацетилтрансфераза, КФ 2.3.1.9.	57,5	50,7	45,1	57,4	51,1	43,8
ГМГ-КоА-синтаза, КФ 2.3.3.10.	72,3	62,7	66,5	97,7	89,6	94,8
ГМГ-КоА-редуктаза, КФ 1.1.1.34.	72,7	61,4	57,1	95,8	86,2	92,9

При воздействии глюкозы структурных изменений в гистологических препаратах гепатопанкреаса двух видов моллюсков не выявлено. Этанол у прудовиков, но не у катушек роговых, вызывал увеличение размеров ацинусов гепатопанкреаса (2,739 нм до 4,686 нм). При введении стрептозотоцина у моллюсков отмечено увеличение количества секреторных клеток.

Результаты моделирования процессов, связанных с избыточным поступлением в организм глюкозы представлены в таблице 2.

Табл. 2. Влияние глюкозы на показатели метаболизма в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков (верхняя строка – *Planorbis corneus*, нижняя строка – *Lymnaea stagnalis*)

Группы	Глюкоза ммоль/л	Общий белок г/л	Мочевая к-та ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Холестерин ммоль/л
Контроль, 12 ч	0,70±0,01	21,40±0,10	127,00±0,80	7,10±0,05	0,37±0,01
	0,42±0,01	5,90±0,08	63,3±0,30	6,40±0,07	0,68±0,03
Контроль, 24 ч	0,70±0,04	21,50±0,10	127,30±0,70	6,90±0,08	0,37±0,01
	0,40±0,01	5,90±0,08	63,3±0,30	6,40±0,07	0,68±0,03
0,05%, 12 ч	0,71±0,03	23,31±0,10 ¹	127,06±0,80	6,80±0,07	0,38±0,02
	0,50±0,02 ¹	5,70±0,09	65,4±0,40 ¹	6,30±0,09	0,70±0,02
0,1%, 12 ч	0,81±0,02 ¹	24,10±0,20 ¹	131,30±1,20 ¹	7,01±0,08	0,38±0,01
	0,72±0,02 ¹	5,90±0,09	68,0±0,40 ¹	6,80±0,06 ¹	0,65±0,02
0,15%, 12 ч	0,83±0,01 ¹	24,70±0,20 ¹	130,60±1,30 ¹	6,51±0,06	0,39±0,02
	0,70±0,03 ¹	6,10±0,10	70,3±0,50 ¹	5,90±0,06 ¹	0,67±0,02
0,5%, 12 ч	1,40±0,02 ¹	24,32±0,20 ¹	145,60±1,90 ¹	5,80±0,05	0,48±0,02 ¹
	0,91±0,04 ¹	7,20±0,08 ¹	79,6±1,00 ¹	5,00±0,06 ¹	0,65±0,02
0,05%, 24 ч	0,72±0,02	23,41±0,30 ¹	126,80±0,70	6,80±0,07	0,44±0,02 ¹
	0,40±0,01	5,09±0,08	62,3±0,90	6,30±0,09	0,66±0,02
0,1%, 24 ч	0,70±0,02	23,90±0,09 ¹	127,50±0,50	7,02±0,08	0,46±0,02 ¹
	0,62±0,03 ¹	5,70±0,09	71,0±1,20 ¹	6,70±0,06 ¹	0,67±0,02
0,15%, 24 ч	0,70±0,03	24,42±0,30 ¹	130,01±0,80 ¹	6,51±0,06	0,45±0,02
	0,63±0,06 ¹	7,50±0,07 ¹	66,9±1,00 ¹	5,80±0,07 ¹	0,69±0,03
0,5%, 24 ч	1,40±0,04 ¹	23,51±0,05 ¹	130,22±0,6 ¹	5,80±0,05	0,45±0,03
	0,90±0,03 ¹	8,20±0,03 ¹	75,6±1,09 ¹	5,00±0,06 ¹	0,66±0,03

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «Контроль 12 часов», поскольку контрольные значения изучаемых показателей практически одинаковы на протяжении суток

Прежде всего следует обратить внимание на различия в биохимических показателях гемолимфы контрольных групп легочных пресноводных моллюсков. У роговых катушек по сравнению с прудовиками обыкновенными выявлено более высокое содержание биохимических показателей в гемолимфе: в 3,63 раза – общего белка, в 2,01 раза – уровня мочевой кислоты, в 1,67 раза – количества глюкозы, примерно одинаковое содержание мочевины и наполовину меньшее содержание холестерина. Биохимические показатели гемолимфы роговых катушек оказались более близкими к биохимическим показателям крови человека, что, вероятно, определяется аналогичным типом транспорта кислорода. Обнаружено полное совпадение величин мочевины, свидетельствующее о функционировании цикла мочевины в клетках гепатопанкреаса, а также всего двукратное уменьшение содержания мочевой кислоты, играющей важную роль в антиоксидантных процессах и трехкратное уменьшение содержания общего белка, характеризующего состояние обмена белков и поддержание онкотического давления.

Содержание в ванночках с глюкозой в диапазоне концентраций 0,1 %–0,5 % вызывало повышение уровня глюкозы в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков. Спустя 24 часа этот эффект проявлялся при концентрации глюкозы 0,5 %. Таким образом выявлен диапазон концентраций вводимой глюкозы, который проявляется гипергликемией в течение 12 часов. Этот эффект показывает степень реактивности инсулярного аппарата катушек. Уровень общего белка повышался у роговых катушек при всех концентрациях вводимой глюкозы, а у прудовиков обыкновенных увеличение общего белка было зарегистрировано только через 12 часов при концентрации глюкозы 0,5 % и спустя 24 часа при концентрациях вводимой глюкозы 0,15–0,5 %. Этот эффект можно связать с анаболическим действием инсулина. Уровень мочевой кислоты также повышался в гемолимфе после введения глюкозы, за исключением действия малых концентраций глюкозы (0,05 %) через 12 часов у роговых катушек, а также через 24 часа у обоих видов моллюсков при концентрации глюкозы 0,05 % и роговых катушек при концентрации глюкозы 0,1 %. Возможно, это результат стимуляции биосинтеза пуриновых азотистых оснований или распада нуклеиновых кислот для повышения антиоксидантного потенциала гемолимфы. Уровень мочевины, являющейся показателем обезвреживания аммиака в печени, при всех вариантах введения глюкозы не изменялся у роговых катушек. У прудовиков обыкновенных содержание мочевины повышалось в

гемолимфе при воздействии глюкозы с концентрацией 0,1 % через 12 часов и через 24 часа. При высоких концентрациях глюкозы (0,15 и 0,5 %) через 12 часов и 24 часа у прудовиков обыкновенных выявлено снижение концентрации мочевины. По всей видимости, малые концентрации вводимой глюкозы не оказывали неблагоприятного влияния на метаболизм клеток гепатопанкреаса, но при относительно высоких уровнях вводимой глюкозы проявилось ингибирующее действие на процессы обезвреживания аммиака в печени. Обращает на себя внимание повышение уровня общего холестерина при введении глюкозы в концентрации 0,5 % через 12 часов, а также при введении глюкозы в низких концентрациях (0,05–0,1 %) через 24 часа. Вероятно, это позднее проявление введения циркулирующего источника энергии на метаболизм, в данном случае – биосинтез холестерина. Полученные результаты показали диапазоны концентрации глюкозы, при котором, используя катушки роговые, можно исследовать процессы мочевинообразования. У прудовиков введение глюкозы не оказало влияния на содержание холестерина в гемолимфе.

В таблице 3 приведены результаты биохимического исследования гемолимфы легочных пресноводных моллюсков при введении стрептозотацина.

Табл. 3 Влияние стрептозотацина на некоторые показатели метаболизма в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков (верхняя строка – *Planorbarius corneus*, нижняя строка – *Lymnaea stagnalis*)

Группы	Глюкоза ммоль/л	Общий белок г/л	Мочевая к-та мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Холестерин ммоль/л
Контроль	0,70±0,02 0,43±0,01	21,3±0,06 5,90±0,04	126,9±0,67 63,1±0,35	7,12±0,04 6,50±0,03	0,37±0,01 0,58±0,03
Контроль, 24 ч	0,71±0,03 0,42±0,02	21,6±0,14 5,90±0,08	127,3±0,76 63,6±0,27	7,13±0,04 6,52±0,04	0,37±0,02 0,58±0,02
Контроль, 48 ч	0,71±0,03 0,42±0,03	21,6±0,14 5,91±0,05	127,1±0,74 63,5±0,36	7,16±0,04 6,53±0,06	0,40±0,02 0,55±0,03
Стрептозотацин, 35 мг/г, 24 ч	0,82±0,02 ¹ 0,80±0,03 ¹	21,3±0,06 5,10±0,03 ¹	129,4±0,43 ¹ 65,9±0,29 ¹	7,35±0,03 ¹ 6,67±0,01 ¹	0,42±0,03 0,56±0,05
Стрептозотацин, 80 мг/г, 24 ч	1,41±0,02 ¹ 1,12±0,01 ¹	20,6±0,09 ¹ 4,90±0,02 ¹	132,1±0,62 ¹ 72,3±0,53 ¹	7,84±0,07 ¹ 6,86±0,02 ¹	0,41±0,02 0,60±0,02 ¹

Продолжение таблицы 3

Стрептозотацин, 100 мг/г, 24 ч	1,81±0,02 ¹ 1,30±0,02 ¹	19,7±0,09 ¹ 4,71±0,03 ¹	134,1±0,69 ¹ 74,0±0,38 ¹	7,92±0,03 ¹ 7,25±0,07 ¹	0,53±0,02 ¹ 0,65±0,02 ¹
Стрептозотацин, 35 мг/г, 48 ч	1,03±0,02 ¹ 1,05±0,02 ¹	17,8±0,09 ¹ 4,51±0,09 ¹	137,1±0,46 ¹ 66,6±0,76 ¹	7,32±0,01 ¹ 6,71±0,01 ¹	0,41±0,02 0,58±0,03
Стрептозотацин, 80 мг/г, 48 ч	1,63±0,02 ¹ 1,24±0,02 ¹	16,2±0,07 ¹ 4,52±0,11 ¹	138,6±0,22 ¹ 72,5±0,70 ¹	7,84±0,03 ¹ 7,52±0,02 ¹	0,52±0,04 0,60±0,02 ¹
Стрептозотацин, 100 мг/г, 48 ч	1,90±0,03 ¹ 1,51±0,02 ¹	13,5±0,10 ¹ 3,30±0,07 ¹	140,1±0,46 ¹ 74,3±0,63 ¹	8,31±0,01 ¹ 8,20±0,02 ¹	0,61±0,02 ¹ 0,71±0,03 ¹

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующими контрольными группами легочных пресноводных моллюсков

Введение стрептозотацина обеспечило примерно одинаковые гипергликемические эффекты у обследованных легочных пресноводных моллюсков [21, 22]. При введении возрастающих доз стрептозотацина на протяжении 48 часов увеличивалась концентрация глюкозы, мочевой кислоты, мочевины и уменьшалась концентрация общего белка в гемолимфе обоих видов моллюсков. Уровень холестерина увеличивался у прудовиков при дозах 80 мг/г и 100 мг/г через 24 и 48 часов, а у катушек этот эффект выявлен лишь при введении стрептозотацина в дозе 100 мг/г через 24 и 48 часов. Эти результаты напоминают результаты введения глюкозы, но без эффектов инсулина. Поэтому изучение гомеостаза глюкозы при алиментарной и индуцированной стрептозотацином гипергликемии возможно проводить на легочных пресноводных моллюсках.

В таблице 4 представлены данные о результатах однократного воздействия экзогенного этанола на биохимические показатели легочных пресноводных моллюсков.

Табл. 4. Влияние этанола на показатели метаболизма в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков (верхняя строка – *Planorbarius corneus*, нижняя строка – *Lymnaea stagnalis*)

Группы	Глюкоза ммоль/л	Общ.белок г/л	Мочевая к-та ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Холестерин ммоль/л
Контроль, 12 ч	0,70±0,01 0,42±0,01	21,40±0,10 5,90±0,08	127,00±0,80 63,3±0,30	7,10±0,05 6,40±0,07	0,37±0,01 0,68±0,03
Контроль, 24 ч	0,70±0,04 0,40±0,01	21,50±0,10 5,90±0,08	127,30±0,70 63,3±0,30	6,90±0,08 6,40±0,07	0,37±0,01 0,68±0,03
0,1 %, 12 ч	0,71±0,03 0,60±0,02	23,71±0,02 ¹ 5,80±0,07	127,10±0,80 63,7±0,5	7,07±0,05 6,30±0,04	0,40±0,01 0,70±0,01
0,5 %, 12 ч	0,82±0,02 0,80±0,02	21,60±0,07 5,30±0,06 ¹	133,00±1,10 ¹ 70,3±0,7 ¹	7,55±0,03 ¹ 6,60±0,05 ¹	0,40±0,01 ¹ 0,80±0,02
5 %, 12 ч	1,10±0,02 ¹ 1,00±0,02 ¹	20,03±0,10 ¹ 4,60±0,1 ¹	135,60±0,60 ¹ 73,8±0,3 ¹	8,02±0,03 ¹ 7,20±0,07 ¹	0,60±0,02 ¹ 0,80±0,02 ¹
0,1 %, 24 ч	0,70±0,02 0,50±0,008	23,90±0,10 ¹ 5,90±0,08	127,20±0,60 63,4±0,6	6,80±0,05 6,30±0,05	0,50±0,01 ¹ 0,80±0,008
0,5 %, 24 ч	0,80±0,03 ¹ 0,90±0,008 ¹	23,01±0,11 ¹ 6,20±0,05 ¹	128,80±0,50 70,5±0,6	7,40±0,02 ¹ 6,70±0,04 ¹	0,60±0,03 ¹ 0,80±0,01
5 %, 24 ч	1,22±0,03 ¹ 1,00±0,01 ¹	21,70±0,09 5,90±0,1	130,80±0,60 ¹ 69,8±0,8	7,50±0,03 ¹ 6,60±0,02 ¹	0,60±0,02 ¹ 0,80±0,01

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующими контрольными группами легочных пресноводных моллюсков.

Все концентрации вводимого этанола (0,1 %, 0,5 % и 5 %) вызвали в гемолимфе катушек повышение уровня холестерина, что, вероятно, связано с поступлением эффективного источника энергии, легко включающегося в общий путь катаболизма и через ацетил-КоА способного увеличивать концентрацию холестерина. Однако введение этанола привело к повышению уровня мочевины, мочевой кислоты и глюкозы, особенно при самой высокой дозе вводимого спирта. Содержание общего белка в гемолимфе катушек изменялось разнонаправлено. В гемолимфе прудовиков обыкновенных найдены близкие изменения уровней мочевины, мочевой кислоты, общего белка и глюкозы. Основным отличием между двумя видами легочных пресноводных моллюсков в реакции на введение растворов этанола явилось отсутствие систематического повышения уровня холестерина. Возможно, это связано с тем, что у моллюска с переносчиком кислорода гемоглобином исходная концентрация холестерина почти в два раза ниже, чем у прудовиков.

В таблице 5 представлены биохимические изменения в гемолимфе прудовиков обыкновенных (*Lymnaea stagnalis*) при хроническом воздействии этанола.

Табл. 5. Влияние этанола при длительном воздействии на показатели метаболизма в гемолимфе прудовика обыкновенного

Группы	Глюкоза, ммоль/л	Общий белок, г/л	Мочевая к-та, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Холестерол, ммоль/л
Контроль	0,41±0,04	5,91±0,06	63,4±0,50	6,40±0,06	0,68±0,03
3 % этанол, 10 суток	0,24±0,05 ¹	9,30±0,05 ¹	67,6±0,91 ¹	6,91±0,06 ¹	0,92±0,07 ¹
3 % этанол, 20 суток	0,13±0,01 ¹	7,21±0,08 ¹	73,8±0,52 ¹	7,33±0,03 ¹	1,07±0,06 ¹

Примечание: ¹ – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой

При хроническом введении этанола в гемолимфе у прудовиков выявлено последовательное снижение концентрации глюкозы на фоне повышения содержания общего белка, мочевой кислоты, мочевины и холестерина. Полученные результаты означают, что прудовики обыкновенные могут использоваться для изучения алкогольной зависимости не только по реактивности нервной системы, но и по параметрам метаболизма.

Заключение. Опыты с введением глюкозы и стрептозотоцина показали, что прудовики обыкновенные и катушки роговые в паре могут применяться для оценки состояния метаболизма при физиологической стимуляции обмена веществ введением циркулирующих источников энергии (глюкозы) и нарушении регуляции инсулином обмена глюкозы при введении стрептозотоцина. Кроме того, прудовики и катушки роговые могут рассматриваться как возможные объекты для исследования негативных эффектов этанола с использованием концентраций в диапазоне 0,1–5,0 %. В Республике Беларусь легочные пресноводные моллюски широко используются для исследования различных нейробиологических проблем при некоторых нарушениях обмена веществ. В данной статье использован метод погружения моллюсков в жидкость, разработанный на кафедре физиологии человека и животных БГУ [22, 23].

В недавнем обзоре литературы с названием «Чему мы можем научить *Lymnaea* и чему нас может научить *Lymnaea*?» описаны преимущества использования моллюска *Lymnaea stagnalis* для изучения нейронной основы обучения и памяти при классическом обусловливании аппетита и избегания; приведено множество поведенческих тестов, которые применяются для выявления способностей памяти и возможность использовать улиток при трансляционных исследованиях в медико-биологических исследованиях [24].

Таким образом, проведенные исследования показали, что легочные пресноводные моллюски могут использоваться для оценки действия водорастворимых веществ на обмен веществ. Для них характерны некоторые преимущества по сравнению с млекопитающими: соответствие международным этическим требованиям, доступность и дешевизна, отсутствие потребности в специальном оборудовании и обслуживании, возможность получения адекватной информации по циркулирующим в жидкостях организма биохимическим показателям (глюкоза, общий белок, мочевая кислота, мочевина, холестерол).

Литература:

- [1] Bui H.B., Inaba K. Structures, mechanisms, and physiological function of zinc transporters in different biological kingdoms // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(5). P. 3045.
- [2] Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Семенов И.О., Пинчук П.Ю. Отбор модельных организмов для биомедицинских исследований посредством изучения молекулярно-структурной гомологии протеолитических ферментов // Новости медико-биологических наук. 2022. Т. 22. № 3. С. 214–218.
- [3] Levitt D. E., Bourgeois B.L., Rodríguez-Graciani K.M. et al. Alcohol impairs bioenergetics and differentiation capacity of mioblasts from simian immunodeficiency virus-infected female macaques // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol.25(4). P. 2448.
- [4] Liao S.F., Ji F., Fan P., Denryter K. Swine gastrointestinal microbiota and the effect of dietary amino acids on its composition and metabolipm // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(2). P.1237. <https://doi.org/10.3390/ijms25021237>.
- [5] Ronghao Zhang R., Jadhav D.A., Najeong Kim N. et al. Profiling cell heterogeneity and fructose transporter expression in the rat nephron by integrating single-cell and microdissected tubule segment transcriptomes // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol.25(5). P. 3071.
- [6] Suiwal S., Wartenberg P., Boehm U. et al. A novel Cre recombinase mouse strain for cell-specific deletion of floxed genes in ribbon sinapse-forming retinal neurons // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(3). P. 1916.
- [7] Wong S.K., Chin K.Y., Suhaimi F.H., Fairus A., Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review // Nutr. Metab. (Lond). 2016. Vol.13. P. 65.

- [8] Hu W., Lazar M.A. Modelling metabolic diseases and drug response using stem cells and organoids // Nat. Rev. Endocrinol. 2022. Vol. 18. P. 744–759.
- [9] Sharma A., Sances, S., Workman, M. J., Svendsen, C. N. Multi-lineage human iPSC-derived platforms for disease modeling and drug discovery // Cell Stem Cell. 2020. 26(3). P. 309–329.
- [10] Marsee, A., Roos F.J.M., Verstegen M.M.A. et al. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids // Cell Stem Cell. 2021. Vol. 28 (5). P. 816–832.
- [11] Meishuang Li, Xiyun Guo, Linxin Cheng et al. Porcine kidney organoids derived from native-like embryonic stem cells // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25(1). P. 682.
- [12] Richelle, A., Kellman B.P., Wenzel A.T. et al. Model-based assessment of mammalian cell metabolic functionalities using omics data // Cell Reports Methods. 2021. Vol. 1 (3). P. 100040.
- [13] Wu, X., Xu, M., Geng, M. et al. Targeting protein modifications in metabolic diseases: molecular mechanisms and targeted therapies // Sig Transduct Target Ther. 2023. Vol. 8. P. 220. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01439-y>.
- [14] Sghaireen M.G., Al-Smadi Y., Al-Qerem A. et al. Machine learning approach for metabolic syndrome diagnosis using explainable data-augmentation-based classification // Diagnostics. 2022. Vol. 12(12). P. 3117. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12123117>.
- [15] Андреева Д.Д., Синегузов А.А., Бурзак Н.А. и др. Трансгенные модельные объекты нового поколения и их использование в персонализированной медицине // Российский журнал персонализированной медицины. 2021. Том 1(1). С. 95–117.
- [16] Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография. Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. 124 с.
- [17] Чиркин А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Долматова В.В., Семенов И.О. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции // Весці НАН Беларусі. Серыя хім. навук. 2021. Т. 57 №. 2. С. 206–2017.
- [18] Kuroda R., Abe M. The pond snail *Lymnaea stagnalis* // EvoDevo. 2020. Vol. 11(1). P. 24.
- [19] Rosato M., Hoelscher B., Lin Z. et al. Transcriptome analysis provides genome annotation and expression profiles in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* at different ages // BMC Genomics. 2021. Vol. 22(1). P. 637.
- [20] Orlov I.A., Ataev G.L., Gourbal B., Tokmakova A.S. et al. The transcriptomic analysis of *Planorbarius corneus* hemocytes (Gastropoda) naturally infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) // Dev. Comp. Immunol. 2023. Vol. 140. P. 104607.
- [21] Чиркин А.А., Данченко Е.О., Толкачева Т.А. и др. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков // Новости медико-биологических наук, 2016. Том. 14, №3. С. 28–32.
- [22] Сидоров А.В. Нейромодуляторное действие пероксида водорода на центральные нейроны пищевой сети моллюска *Lymnaea stagnalis* // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2017. Т. 53, № 6. С. 437–443.
- [23] Шаденко В.Н. Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Мн.: Ин-т физиологии НАН Беларуси, 2009. 23 с.
- [24] Rivi V., Benatti C., Lukowiak K., Colliva C. et al. What can we teach *Lymnaea* and what can *Lymnaea* teach us? // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2021. Vol. 96 (4). P. 1590–1602.

A. A. CHIRKIN, P. YU. PINCHUK, M. V. VISHNEVSKAYA, O. M. BALAEVA-TIKHOMIROVA

USE OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSKS FOR STUDYING METABOLIC DISORDERS

Educational institution "Vitebsk State University named after P.M. Masharov", Vitebsk, Republic of Belarus

Summary

The article presents data on the molecular structural similarity of 20 enzymes that control the content of glucose, total protein, uric acid, urea and cholesterol in the blood serum of humans, laboratory rats and in the hemolymph of the pulmonary freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* as part of the search for simple and accessible organisms that can be used to study the characteristics of metabolism under the influence of pathological factors. Experiments with the introduction of glucose have shown that common pond snails (*Lymnaea stagnalis*) and horned pond snails (*Planorbarius corneus*), which are the closest relatives of *Biomphalaria glabrata*, in pairs can serve as possible organisms for assessing the state of metabolism during physiological stimulation of metabolism by administering glucose in concentrations of 0,05–0,5 %, disruption of insulin regulation of carbohydrate metabolism by administration of streptozotocin in doses of 35–100 mcg/g and modeling of the toxic effects of ethanol in the concentration range of 0,1–5,0 %.

Key words: circulating molecules, human, rat, pulmonary freshwater molluscs, metabolic disorders, streptozotocin, ethanol.

В. В. ДАВЫДОВ, С. В. ЖАВОРОНОК

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА Е К ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ ХОЗЯИНА

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь*

Проведены биоинформатические исследования 309 последовательностей генома вируса гепатита Е (ВГЕ) 1-го и 3-го генотипов, выделенных из организма человека и животных. Определены предпочтения в использовании синонимичных кодонов ВГЕ, по сравнению с широким кругом хозяев. Рассчитаны индексы CAI, RCDI и SiD. Установлены различия в адаптированности ВГЕ к хозяину. Наиболее высокую степень адаптации последовательности ВГЕ, имеют к использованию кодонов в клетках приматов, грызунов, кроликов и птиц. Использование синонимичных кодонов в клетках одомашненных свиней и верблюдов имеет более высокую степень сходства с ВГЕ, чем экспрессионные системы дикого кабана, благородного оленя и лося. Последовательности ВГЕ-3, характеризуются более высокой адаптированностью к экспрессии в клетках разных хозяев, чем последовательности ВГЕ-1, которые характеризуются равно высокой степенью адаптированности к экспрессии генов как в клетках человека, так и в клетках разных видов животных, что является результатом эволюции этого генотипа вируса, в результате которой произошло сужение круга его потенциальных хозяев.

Ключевые слова: биоинформатический анализ, вирус гепатита Е, использование синонимичных кодонов, адаптация вируса к организму хозяина.

Введение. Аминокислоты являются мономерами белковых молекул. В соответствии с центральной догмой молекулярной биологии передача генетической информации в живых системах происходит от ее носителя, которым является ДНК или РНК, к полипептиду в соответствии с генетическим кодом, который обладает свойством триплетности – одну аминокислоту кодирует три нуклеотида (кодон). В стандартном генетическом коде набор из 61 кодона кодирует 20 аминокислот. Для кодирования одной аминокислоты в теоретической модели все синонимичные кодоны должны использоваться равновероятно, однако это не так. Смещение или предвзятость использования кодонов (от англ. «Codon Usage Bias, CUB») – это явление, при котором в геноме организма или в различных генах одного организма определенные кодоны более предпочтительно используются в кодирующих областях, вместо их синонимичных альтернатив. Определенные кодоны могут эффективнее использоваться рибосомами, это может быть связано с количеством и аффинностью транспортных РНК (тРНК) к определенным кодонам. Установлена связь между уровнем экспрессии генов тРНК и использованием определенных кодонов в наборе высоко экспрессирующихся генов, специфичных для определенных тканей [13], что свидетельствует о тканеспецифичности CUB у многоклеточных организмов. Определенные кодоны могут улучшать точность трансляции и снижать вероятность ошибок, тогда как использование других кодонов, наоборот, может ее ускорять. Существует предположение, что использование редких кодонов замедляет скорость трансляции, чтобы обеспечить оптимальные уровни экспрессии белка и его правильную укладку [10]. Мутации и генетический дрейф являются основными факторами, определяющими конфигурацию паттернов использования кодонов в геномах различных вирусов. Исследование ограничений в использовании кодонов дает информацию о молекулярной эволюции генов вирусов, регуляции их экспрессии, а также полезно для биотехнологии. Экспрессия белков вируса в гетерологичных хозяевах может сопровождаться значительными трудностями. Их гены могут содержать кодоны, которые редко используются у предполагаемого хозяина, трансгены могут происходить от организмов, использующих неканонический код, или содержать регуляторные элементы, ограничивающие экспрессию, в кодирующей последовательности [4]. Таким образом изучение различий CUB геномов вирусов и их хозяев открывает возможности для разработки дизайна рекомбинантных вакцин, для которых необходима активная экспрессия вирусных белков для создания эффективных иммунных ответов во внутриклеточной среде хозяина.

Цель исследования – изучение генетических маркеров ВГЕ, свидетельствующих о степени

адаптации генома вируса к экспрессии его генов в организме разных хозяев.

Материалы и методы исследования. Полные кодирующие последовательности (CDS) открытых рамок считывания (ORC1, ORC2 и ORC3) геномов ВГЕ 1-го (n=61) и 3-го генотипов, выделенных из организма человека (n=148) и животных (n=100) были извлечены из базы данных GenBank в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Перед проведением исследований из ORC1 во всех последовательностях была удалена гипервариабельная область. Из ORC2 была удалена область, перекрывающаяся с ORC3. В анализе использовались только такие записи, которые имели одинаковую длину, были точно кратны трем нуклеотидам и имели правильный стартовый и стоп-кодон. Все последовательности были выровнены с помощью программы MEGA 11.0 [9] с использованием алгоритма CLUSTAL W [12]. Всего в этом исследовании было проанализировано 309 последовательностей генома ВГЕ.

Индекс адаптации кодонов (от англ. «Codon adaptation index», CAI) – это показатель, характеризующий степень сходства между использованием синонимичных кодонов исследуемого гена вируса и эталонного набора, представляющего собой таблицу использования кодонов в организме хозяина. Значение CAI находится в диапазоне от 0 до 1. Более высокие значения CAI указывают на более высокую адаптивность вируса к внутриклеточной среде хозяина и более высокий уровень экспрессии его генов. Значения CAI рассчитывали на Сервере CAIcal (<http://genomes.urv.cat/CAIcal/>) [7] с использованием эталонных таблиц использования кодонов для видов, являющихся хозяевами для ВГЕ.

Для определения возможной скорости трансляции вирусного гена в клетке хозяина определяли индекс относительной деоптимизации кодонов (от англ. «Relative codon deoptimization index», RCDI) [6]. Значения RCDI рассчитывали на сервере RCDI/eRCDI (<http://genomes.urv.cat/CAIcal/>) [8] с использованием эталонных таблиц использования кодонов для видов, являющихся хозяевами для ВГЕ. Эталонные таблицы использования кодонов в организме хозяина ВГЕ и гепатоцитах человека загружали из специализированной базы в сети Интернет «CoCoPUTs (Codon Pair and Dinucleotide Usage Data)», доступной по адресу https://dnahive.fda.gov/dna.cgi?cmd=codon_usage&id=537&mode=cocoputs. Значение RCDI варьируется от 1 (использование кодонов полностью оптимизировано для использования кодонов в эталонном геноме) до более высоких значений при деоптимизации тестируемой последовательности [2].

Индекс подобия (от англ. «Similarity Index», SiD) [14] рассчитывался по следующей формуле:

$$R(A, B) = \frac{\sum_{i=1}^{59} a_i \times b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{59} a_i^2 \times \sum_{i=1}^{59} b_i^2}}$$

где a_i — значение RSCU для конкретного кодона для кодирующей последовательности ВГЕ, b_i — значение RSCU для аналогичного кодона хозяина.

В соответствии с данным методом, сходство использования кодонов хозяином и вирусом $R(A, B)$ определяется как значение косинуса угла, включенного между пространственными векторами A и B путем рассмотрения 59 кодонов как 59 различных пространственных векторов. $D(A, B)$ представляет собой величину силы потенциального влияния общего использования кодонов хозяином на ВГЕ.

$$D(A, B) = \frac{1 - R(A, B)}{2}$$

Значение SiD колеблется от 0 до 1,0. Чем больше значение индекса, тем больше влияние хозяина на использование кодонов ВГЕ.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что наиболее высокие значения CAI были характерны для эталонных наборов использования кодонов в клетках Курицы банкивской джунглевой, который по результатам эпидемиологических исследований на является хозяином ВГЕ (рисунок 1). Кроме этого вида также высокие значения CAI были характерны для Приматов, в том числе и Человека, а также для Кролика и Грызунов. Другим неожиданным результатом были очень низкие значения индекса для клеток дикого кабана, которые оказались даже ниже, чем в клетках кишечной палочки, которая не рассматривалась как потенциальный хозяин и была включена в исследование только в качестве группы сравнения.

Значение индекса CAI существенно зависело от исследуемой ОРС и генотипа вируса.

Наибольшие значения показателя были характерны для OPC1. Индекс адаптации последовательностей OPC2 находился на более низком уровне. Значения САИ для OPC3, в большинстве случаев, был еще ниже. Исключение составляли дикие кабаны. Показатель адаптированности последовательностей OPC3 к этим хозяевам был более высоким, чем для последовательностей OPC2.

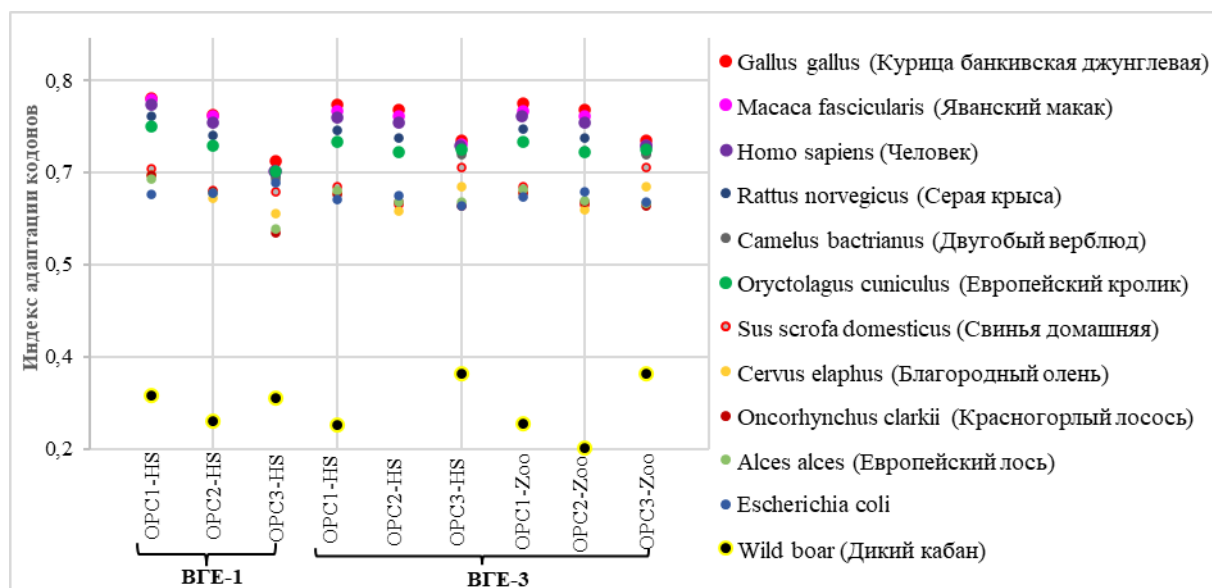


Рис. 1. Значения индекса адаптации кодонов в последовательностях OPC1, OPC2 и OPC3 ВГЕ-1 и ВГЕ-3 к использованию кодонов в различных хозяевах ВГЕ

Наиболее высокие значения RCDI для всех OPC всех генотипов (хозяев) были установлены для Дикого кабана. Значения индекса для этого хозяина в большинстве случаев превышали показатель всех других изученных видов, являющихся потенциальными хозяевами ВГЕ, в два раза, что свидетельствует об очень низкой адаптации диких кабанов к обеспечению экспрессии генов ВГЕ в их клетках (рисунок 2). Выявлены незначительные различия показателя RCDI последовательностей ВГЕ-1 и ВГЕ-3, заключающиеся в более низком значении индекса для ВГЕ-3 по отношению к большинству хозяев.

Индекс RCDI имел наименьшее значение для гена, отвечающего за репликацию РНК ВГЕ (OPC1) и не имел существенных отличий у разных хозяев вируса, что свидетельствует о высоком и потенциально одинаковом уровне экспрессии этого гена в клетках их организма.

Индекс RCDI имел наименьшее значение для гена, отвечающего за репликацию РНК ВГЕ (OPC1) и не имел существенных отличий у разных хозяев вируса, что свидетельствует о высоком и потенциально одинаковом уровне экспрессии этого гена в клетках их организма.

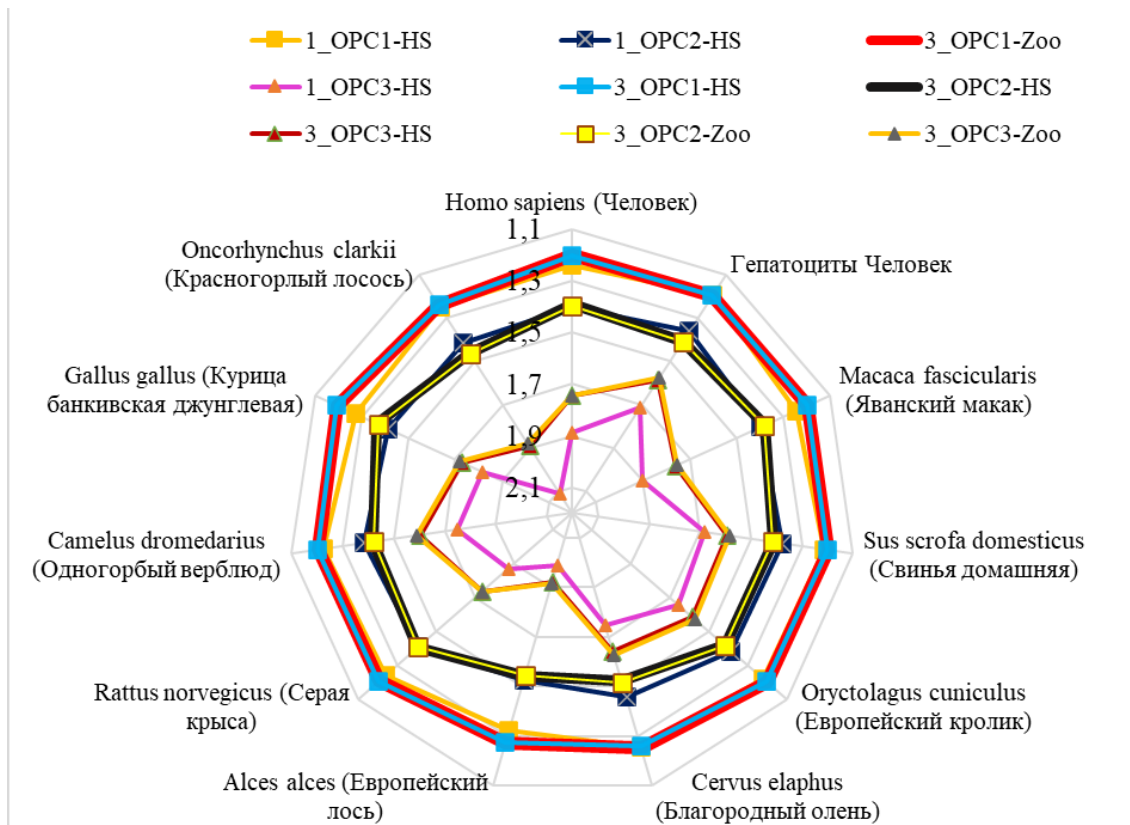


Рис. 2. Значения индекса относительной деоптимизации кодонов в последовательностях OPC1, OPC2 и OPC3 ВГЕ-1 и ВГЕ-3 к использованию кодонов в различных хозяевах ВГЕ

Значение RCDI гена, кодирующего белок капсида вируса (OPC2), находилось на более высоком уровне, чем OPC1, что свидетельствует о менее выраженной адаптации к экспрессии этого гена в организме изученных хозяев. Для всех изученных хозяев (за исключением дикого кабана) индекс деоптимизации кодонов, как для последовательностей OPC1, так и OPC2, приобретал близкие значения, что свидетельствует о сходных уровнях возможной экспрессии этих генов в клетках организма изученного круга хозяев. Значение RCDI для OPC3 было наибольшим для всех изученных хозяев, особенно для последовательности ВГЕ-1, что является свидетельством меньшей адаптированности гена вируса, отвечающего за выход вируса из клетки, по сравнению с геном, отвечающим за синтез белка его капсида. Значения индекса последовательностей OPC3 для разных хозяев не были близкими по значению, как в случае OPC1 и OPC2. Наибольшее значение этого показателя (кроме дикого кабана) было установлено для Красногорлого лосося, Европейского лося и, что было неожиданным, для Яванского макака. Внутриклеточная среда гепатоцитов человека оказалась наиболее благоприятной для синтеза белка OPC3 ВГЕ, по сравнению с клетками человека в целом.

Изменения индекса подобия (SiD) имели выраженную тенденцию роста от OPC1 к OPC2 и OPC3 (рисунок 3). Данная особенность была характерна для большинства изученных видов-хозяев ВГЕ, в том числе и для кишечной палочки, которая была включена в исследование в качестве внешней группы. Эта особенность не была характерна для диких кабанов, для которых показатели SiD имели иную картину. Значения индекса для этого хозяина, рассчитанные для OPC2 имели более высокие значения, чем для OPC3.

Не смотря на сходный паттерн значений индекса подобия для разных OPC, выявлены отличия в адаптированности ВГЕ к использованию синонимичных кодонов его разными хозяевами. Наибольшим сходством в использовании кодонов по сравнению с ВГЕ характеризовались такие виды, как Человек, Японский макак, одомашненные животные (свиньи, кролики, куры и верблюды), а также синантропные серые крысы. SiD красногорлого лосося также находился на низком уровне. Дикие кабаны, благородный олень и лось имели высокие значения индекса во всех генотипах и рамках считывания.

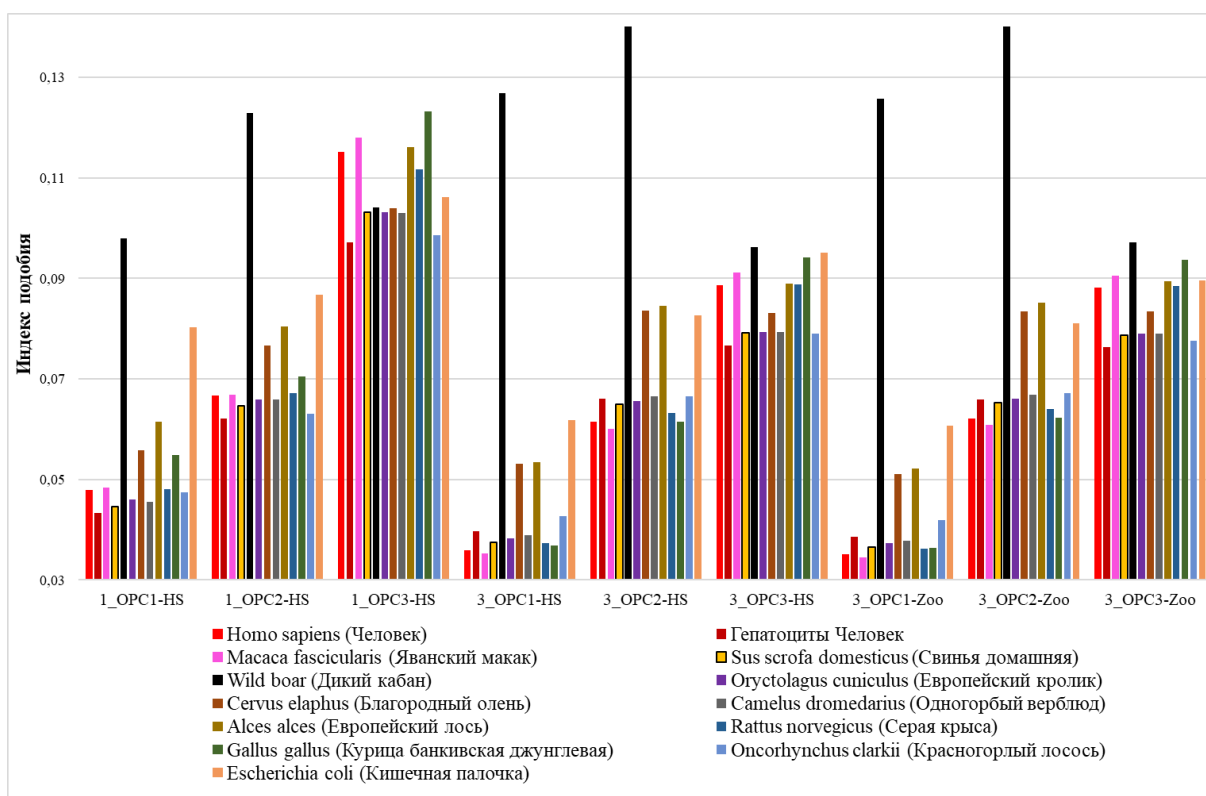


Рис. 3. Значения индекса подобия использования синонимичных кодонов в последовательностях OPC1, OPC2 и OPC3 ВГЕ-1 и ВГЕ-3 к использованию кодонов в различных хозяевах ВГЕ

Значение индекса подобия ВГЕ-1 для печеночной ткани ожидаемо было самым низким по отношению ко всем изученным хозяевам, в том числе ниже, значения SiD, рассчитанного для организма человека в целом. Однако, для ВГЕ-3 значения SiD для гепатоцитов были более высокими, чем для организма человека в целом и даже выше, чем в организме домашней свиньи. Это может свидетельствовать о более широких адаптивных возможностях ВГЕ-3 к репликации в различных тканях хозяина, что может объяснить существование внепеченочных проявлений ВГЕ, сопровождающихся паразитированием вируса в клетках нервной ткани и клетках матки.

Более высокую адаптированность к репликации в клетках большинства хозяев продемонстрировали ВГЕ 3-го генотипа. По сравнению с ВГЕ-1 во всех рамках считывания они характеризовались более низкими значениями SiD для всех изученных хозяев (не только для печеночной ткани), кроме диких кабанов, для которых показатели индекса для ВГЕ-3 были более высокими, чем для ВГЕ-1. Самой высокой адаптированностью к хозяину характеризовались последовательности ВГЕ-3 OPC1. Различий в степени адаптированности последовательностей ВГЕ-3, выделенных из разных хозяев (человек или животные) выявлено не было.

Зависимость вирусов от ключевых внутриклеточных процессов хозяина, таких как репликация и синтез белка, обуславливают прямую зависимость приспособленности, выживаемости и эволюции вируса от использования кодонов вирусом и его хозяином. Информация о том, как вирус использует кодоны может дать представление о факторах, обуславливающих предвзятость использования кодонов, и регуляции экспрессии генов. В этом исследовании мы использовали широкий спектр методов для изучения ключевых факторов, ответственных за предвзятость использования кодонов ВГЕ, вклад использования синонимичных кодонов в эволюционные процессы ВГЕ и приспособленность ВГЕ к различным хозяевам.

В целях определения возможного уровня экспрессии белков вируса у хозяина и адаптации вируса к хозяину был использован индекс адаптации кодонов. Значения индекса CAI в OPC разных генотипов (хозяев) ВГЕ формировали характерный паттерн. Значения CAI OPC1 были более высокими, по сравнению с OPC2, которые в свою очередь были выше показателя OPC3. Данная картина была характерна для всех изученных последовательностей ВГЕ. Результаты исследований свидетельствуют о широких адаптивных возможностях ВГЕ, особенно выраженных в последовательностях генома вируса, отвечающих за его репликацию и образование капсида (OPC1 и OPC2). OPC3 контролирует выход вируса из клетки организма хозяина и в определенной степени

ограничивает спектр его возможных хозяев. В нашем исследовании мы не обнаружили существенно более высокой адаптированности последовательностей ORC1 ВГЕ-1 к человеку по сравнению с другими хозяевами, о которой сообщалось S. Baha и др. Мы не можем подтвердить вывод этих исследователей о том, что установленная ими «адаптация ORC1 ВГЕ-1 к людям может объяснить эпидемический характер инфекций ВГЕ генотипа 1 (в переводе с англ.)» [1]. Полученный в наших исследованиях результат о высокой адаптированности последовательностей ВГЕ к экспрессии его генов в клетках курицы требует дальнейшего изучения.

Индекс RCDI является интегрирующим показателем, позволяющим оценить кумулятивные эффекты смещения использования синонимичных кодонов в геноме вируса, путем сравнения с аналогичным показателем у того или иного хозяина. Полученные нами результаты изучения RCDI в ORC ВГЕ, в целом, дополняют данные об индексе адаптации использования кодонов (CAI) в последовательностях ВГЕ и его хозяев. Подтвержден очень низкий уровень адаптированности всех последовательностей ВГЕ не зависимо от ORC и генотипа к синтезу белка в организме диких кабанов. Также полученные данные о значениях RCDI для различных ORC ВГЕ показывают более высокий уровень адаптированности последовательностей ORC1 и ORC2 и низкий – для ORC3. Выявленные генотип специфические особенности индекса деоптимизации, заключавшиеся в более низком значении RCDI для последовательностей ВГЕ-3 по сравнению с ВГЕ-1, которые противоречат результатам изучения индекса адаптации кодонов CAI, обладали статистической достоверностью только для ORC3. Не смотря на большое количество факторов, влияющих на значение индекса, величины RCDI для ВГЕ-3, выделенных из разных хозяев, рассчитанные для ORC1 (ORC2) имели отличия только в тысячных долях его значения, причем для всех изученных хозяев. Этот невероятный факт, вероятно, свидетельствует об одинаковой степени адаптации ВГЕ-3, выделенных из разных хозяев, и нуждается в подтверждении. Похожие исследования были проведены группой ученых из Китая. В своей работе В. Li и др. [5] рассчитывали RCDI только для тех генотипов и хозяев, которые соответствовали результатам эпидемиологических исследований. Так для ВГЕ-1 показатель был рассчитан только для человека, а для ВГЕ-3 для человека и свиньи и т.д. Результаты исследований, охарактеризованные в нашем исследовании, имеют более обширный характер. Используя более широкий круг хозяев для расчета RCDI, мы демонстрируем практически одинаковую степень адаптированности последовательностей ВГЕ-1 и особенно ВГЕ-3, выделенных из разных хозяев, к трансляции в их клетках, которые ранее не относились к хозяевам ВГЕ.

Использование метода расчета индекса подобия (SiD) позволяет провести всестороннюю оценку степени сходства общего шаблона использования кодонов между вирусом и хозяином, включая в оценку все 59 синонимичных кодонов одновременно как разные 59 пространственные вектора. Преимущество этого подхода заключается в том, что вместо прямой оценки использования каждого синонимичного кодона используется сравнительное общее использование всех кодонов одновременно. Таким образом, этот метод позволяет избежать ситуации, когда вариации значений использования 59 синонимичных кодонов искажают целостную оценку влияния хозяина на вирус.

На основании сходства показателя SiD к хозяевам антропонозного ВГЕ-1 могут быть отнесены и все животные, в которых могут паразитировать ВГЕ-3. Это домашние свиньи, кролики, верблюды, являющиеся хозяином для ВГЕ-7 и даже серые крысы, которые являются хозяином для ВГЕ-С1. С другой стороны, такой хозяин ВГЕ-3, как дикий кабан, продемонстрировал очень высокие уровни SiD, что свидетельствует о низкой адаптации вируса к паразитированию в его клетках. Однако данные, полученные в нашей работе, о более низких значениях индекса для ORC3 по отношению к ORC2 для диких кабанов, являющиеся принципиально иным паттерном, по сравнению с остальными изученными хозяевами, свидетельствует о том, что гены ВГЕ, отвечающие за разные стадии жизненного цикла вируса, в организме этого хозяина имеют другое направление адаптации. Недостаток адаптированности генов ВГЕ, отвечающих за синтез белков капсида (ORC2), может быть в данном случае «компенсирован» более высокой адаптацией последовательности ORC3, обладающей широким спектром функций. Как известно, ORC3 может участвовать в инкапсидации геномной РНК вируса и сборке его капсида, выходе вирионов из клетки хозяина и, возможно, в проникновении вируса в новые клетки, что в данном случае могло обеспечить расширение круга хозяев ВГЕ и включение в него диких кабанов. Вывод, сделанный в работе В. Li и др., о более высокой адаптированности ORC1 по сравнению с ORC-2 полностью соответствует нашим результатам.

Таким образом, на основании анализа индекса деоптимизации кодонов и индекса подобия наше исследование показало, что предвзятость использования кодонов у многих видов животных была практически идентична таковой у зоонозных и антропонозных генотипов ВГЕ, что указывает на

возможность того, что эти животные являются хозяевами для ВГЕ. Предвзятость использования кодонов может частично объяснить предпочтения хозяина зоонозного ВГЕ и дать ориентиры для поиска новых животных-хозяев ВГЕ, но для этого требуются дополнительные биоинформатические, экспериментальные и эпидемиологические данные.

Использование синонимичных кодонов для построения ОРС не является случайным, существуют механистические или эволюционные ограничения, которые определяют степень свободы для построения кодирующей последовательности [11]. Другими словами, каждый организм, в том числе и вирус, использует определенный набор правил для построения последовательностей своих ОРС, которые ограничивают общее количество вариантов, предоставляемых вырожденностью генетического кода. Использование кодонов и предвзятость контекста пар нуклеотидов отражают действие двух основных эволюционных сил: отбора по эффективности трансляции мРНК и мутационного дрейфа, действующего без разбора на кодирующую и некодирующую последовательность [3].

Заключение. Биоинформатический анализ, основанный на установлении сходства в использовании синонимичных кодонов и определении уровня возможной белок синтетической активности генов ВГЕ в разных системах экспрессии (индексы CAI, RCDI и SiD), позволил установить различия в адаптированности ВГЕ к широкому кругу хозяев. Наиболее высокую степень адаптации последовательности ВГЕ, имеют к использованию кодонов в клетках приматов, грызунов, кроликов и птиц. Возможная экспрессия генов ВГЕ в клетках парнокопытных не имеет однозначной оценки. Использование синонимичных кодонов в клетках одомашненных свиней и верблюдов характеризуются высокой степенью сходства с ВГЕ, в то время как адаптация ВГЕ к экспрессионным системам дикого кабана, благородного оленя и лося находятся на низком уровне, что свидетельствует об относительно недавней истории включения в круг хозяев ВГЕ этих видов, вызванного распространением вируса на новые территории и недостаточной сформированности взаимоотношений в этих системах «паразит-хозяин». Последовательности ВГЕ-3, являющегося полигостальным патогеном, характеризуются более высокой адаптированностью к экспрессии в клетках разных хозяев, чем последовательности ВГЕ-1. Последовательности ВГЕ-1, которые по данным эпидемиологических исследований поражают только человека, характеризуются равно высокой степенью адаптированности к экспрессии генов как в клетках человека, так и в клетках разных видов животных, что является результатом эволюции этого генотипа вируса, в результате которой произошло сужение круга его потенциальных хозяев.

Литература:

- [1] Baha S. Comprehensive analysis of genetic and evolutionary features of the hepatitis E virus // BMC Genomics. 2019. Vol. 20. P. 790–812.
- [2] Butt A. Evolution of codon usage in Zika virus genomes is host and vector specific // Emerg. Microbes. Infect. 2016. Vol. 5, P. e107.
- [3] Fedorov A. Regularities of context-dependent codon bias in eukaryotic genes // Nucleic Acids Research. 2002. Vol. 30. P. 1192–1197.
- [4] Gustafsson C. Codon bias and heterologous protein expression // Trends in Biotechnology. 2004. Vol. 22. P. 346–353.
- [5] Li B, Wu H. Codon Usage of Hepatitis E Viruses: A Comprehensive Analysis // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13.
- [6] Mueller S. Reduction of the Rate of Poliovirus Protein Synthesis through Large-Scale Codon Deoptimization Causes Attenuation of Viral Virulence by Lowering Specific Infectivity // Journal of Virology. 2006. Vol. 80. P. 9687–9696.
- [7] Puigbò P. CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation // Biology Direct. 2008. Vol. 3, № 1. P. 38.
- [8] Puigbò P. RCDI/eRCDI: a web-server to estimate codon usage deoptimization // BMC Res Notes. 2010. Vol. 3, № 1. P. 87.
- [9] Tamura K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Molecular Biology and Evolution. 2021. Vol. 38. P. 3022.
- [10] Thanaraj T. A. Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization // Protein Science. 1996. Vol. 5. P. 1594–1612.
- [11] Thomas L. Codon choice and gene expression: synonymous codons differ in their ability to direct aminoacylated-transfer RNA binding to ribosomes in vitro // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988. Vol. 85. P. 4242–4246.
- [12] Thompson J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- [13] Wright F. The ‘effective number of codons’ used in a gene // Gene. 1990. Vol. 87, № 1. P. 23–29.

[14]Zhou J. The Distribution of Synonymous Codon Choice in the Translation Initiation Region of Dengue Virus // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. P. e77239.

V. V. DAVYDOV, S. V. ZHAVORONOK

**GENETIC MARKERS OF HEPATITIS E VIRUS ADAPTATION TO THE HOST'S
INTRACELLULAR ENVIRONMENT**

Educational institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

Summary

Bioinformatic studies of 309 genome sequences of hepatitis E virus (HEV) genotypes 1 and 3 isolated from humans and animals were conducted. Preferences in the use of synonymous HEV codons were determined, compared with a wide range of hosts. CAI, RCDI and SiD indices were calculated. Differences in HEV adaptability to the host were established. The highest degree of adaptation of the HEV sequence to codon use was observed in the cells of primates, rodents, rabbits and birds. Synonymous codon usage in domesticated pig and camel cells has a higher degree of similarity to HEV than the expression systems of wild boar, red deer and elk. HEV-3 sequences are characterized by a higher adaptability to expression in cells of different hosts than HEV-1 sequences, which are characterized by an equally high degree of adaptability to gene expression in both human cells and cells of different animal species, which is a result of the evolution of this genotype of the virus, as a result of which the range of its potential hosts has narrowed.

Keywords: bioinformatics analysis, hepatitis E virus, synonymous codon usage bias, virus adaptation to the host organism.

УДК 616.12-008.331.1:616-056.52]:616.1-06-037-078.088.7

Т. В. РУДЕНКОВА, С. А. КОСТЮК, М. В. ШТОНДА, Т. В. АКОЛА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь*

Развитие артериальной гипертензии (АГ) и связанных с ней сердечно-сосудистых осложнений ассоциированы как со средовыми факторами, так и с индивидуальными генетическими особенностями. В ходе проведенного исследования были изучены ассоциации полиморфизмов в генах *OLR1*, *ADD2*, *SOD2*, *VEGF-A*, *AGT*, *CYP3A5* с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела. Установлено, что присутствие мутантного Т аллеля (rs1050283) в гене *OLR1* ассоциировано с риском развития ишемической болезни сердца и риском прогрессирования хронической сердечной недостаточности. Для мутантного Т аллеля в составе гетерозиготного генотипа GT в гене *ADD1* (rs4961) установлена ассоциация со снижением риска прогрессирования хронической сердечной недостаточности. Полиморфизм G6986A (rs776746) в гене *CYP3A5* был ассоциирован со снижением риска развития всех изученных сердечно-сосудистых осложнений (фибрилляция предсердий, ишемическая болезнь сердца, прогрессирование хронической сердечной недостаточности). Дальнейшие исследования на более широкой выборке пациентов позволяют сформировать более четкие критерии и вклад каждого из полиморфизмов в риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с АГ и избыточной массой тела.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, избыточная масса тела, сердечно-сосудистые осложнения, полиморфизмы.

Введение. Среди пациентов, страдающих артериальной гипертензией (АГ), развитие сердечно-сосудистых заболеваний является одной из основных причин временной и стойкой нетрудоспособности, а также смертности. Снижение количества сердечно-сосудистых осложнений является критической составляющей стратегии ведения пациентов с АГ и актуальной задачей современного здравоохранения, выполнение которой позволит не только повысить качество оказания медицинской помощи, но также улучшить показатели прогноза и выживаемости для пациентов с данной патологией [1, 4].

Во всем мире наблюдается стойкая тенденция к увеличению количества взрослого населения, страдающего АГ. Так с 1990 по 2022 гг. количество пациентов с данной патологией увеличилось более чем в 2 раза. АГ прогрессирует с возрастом, и т.к. в развитых странах наблюдается тенденция к увеличению среднего возраста населения, то распространенность АГ и абсолютные показатели связанных с ней неблагоприятных исходов продолжают увеличиваться [9, 12, 17]. По оценке Всемирной организации здравоохранения, до 54 % инсультов и 47 % случаев ишемической болезни сердца (ИБС) являются прямым следствием повышения артериального давления (АД). При этом количество пациентов с повышенным АД, которые не получают антигипертензивную лекарственную терапию, по данным различных исследований составляет от 20 до 60 % [4].

Одной из важных задач научных исследований является выявление надежных высокоспецифичных маркеров риска развития у пациентов ассоциированных с АГ сердечно-сосудистых заболеваний. Быстрые темпы развития, совершенствования и внедрения в клиническую практику методов молекулярной биологии, позволили активизировать поиск новых молекулярно-генетических маркеров, рутинное определение которых способствовало бы созданию объективных критериев для оценки риска развития осложнений у пациентов с АГ.

Возникновение АГ и развитие сопутствующих сердечно-сосудистых осложнений являются результатом сложного многоуровневого взаимодействия различных факторов: генетических, средовых, поведенческих и социальных. Выявление предрасполагающих факторов, в том числе и

индивидуальных генетических особенностей, является актуальным направлением научных исследований с целью разработки новых подходов к профилактике основного заболевания и его осложнений, а также разработки методик персонализированной терапии, с учетом индивидуальных молекулярно-генетических характеристик каждого пациента. К перспективным для изучения факторам относят наличие полиморфизмов в генах, кодирующих ферменты, которые принимают участие в метаболизме, передаче клеточных сигналов, окислительно-восстановительных реакциях, пролиферации сосудов.

Цель исследования – изучить ассоциации полиморфизмов в генах *OLR1*, *ADD2*, *SOD2*, *VEGF-A*, *AGT*, *CYP3A5* с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с АГ.

Материал и методы исследования. Объектом исследования были пациенты в возрасте 40 лет и старше с установленным диагнозом АГ и индексом массы тела (ИМТ) 25 кг/м² и более, находившиеся на лечении в УЗ «2-я городская клиническая больница» г. Минска. В исследование были включены 79 пациентов с АГ и избыточной массой тела, медиана возраста составила 62,5 года. Распределение по гендерной принадлежности среди обследованных пациентов было равновеликое – 36 мужчин (45,57 %) и 43 женщины (54,43 %). Для выявления ассоциаций генетических факторов с риском развития сердечно-сосудистых осложнений и исследование были включены пациенты с наличием в анамнезе таких патологических состояний как фибрилляция предсердий (ФП), хроническая сердечная недостаточность (ХСН), ишемическая болезнь сердца (ИБС): инфаркт миокарда, стенокардия, реваскуляризация (АКШ, стентирование), а также пациенты без сердечно-сосудистых осложнений.

В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие периферической крови. Периферическую кровь пациентов в объеме не менее 3 мл забирали в стерильные вакуумные пробирки («МиниМед», РФ). В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия. Выделение ДНК из крови проводили с использованием набора реагентов NucleoSpin Blood QuickPure (Macherey-Nagel). Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования («NanoDrop 1000», «Thermo Fisher Scientific»).

ДНК, выделенную из биологического материала пациентов, использовали для амплификации с применением наборов реагентов: «Набор реагентов для определения полиморфизма C1073T гена *OLR1* (rs1050283)» («Синтол», РФ), «Набор реагентов для определения полиморфизма Gly460Trp гена *ADD1* (rs4961)» («Синтол», РФ), «Набор реагентов для определения полиморфизма C47T гена *SOD2* (rs4880)» («Синтол», РФ), «Набор реагентов для определения полиморфизма C2578A гена *VEGFA* (rs699947)» («Синтол», РФ), «Набор реагентов для выявления полиморфизма Thr174Met в гене *AGT*» («Литех», РФ), «Набор реагентов для выявления полиморфизма 6986 G>A в гене *CYP3A5*» («Литех», РФ). Амплификацию проводили на приборе «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи компьютерной программы «Statistica 10». Для категориальных признаков статистический анализ проводили с помощью критерия χ^2 -Пирсона. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частоты выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты и их обсуждение. После клинического обследования пациентов на основании наличия/отсутствия таких проявлений сердечно-сосудистых осложнений как ИБС (инфаркт миокарда, стенокардия, реваскуляризация), ФП, стадия ХСН по классификации Н.Д. Стражеско, В.Х. Василенко, пациенты были разделены на группы (таблица 1).

Табл. 1. Результаты распределения пациентов по группам в зависимости от наличия осложнений АГ (n=79)

Показатель	Группа	Частота выявления	
		n	%
Сердечно-сосудистые осложнения	с осложнениями	53	67,09
	без осложнений	26	32,91
ИБС	без ИБС	28	35,44
	с ИБС	51	64,56
ФП	без ФП	45	56,96
	с ФП	34	43,04
ХСН	стадия 0-1	50	63,29
	стадия 2А-2Б	29	36,71

В образцах ДНК, выделенной из крови пациентов, проводили определение полиморфизмов генов *OLR1* (C1073T, rs1050283), *ADD1* (Gly460Trp, rs4961), *SOD2* (C47T, rs4880), *VEGFA* (C2578A,

rs699947), *CYP3A5* (G6986A, rs776746), *AGT* (Thr174Met, C3389T, rs4762). Полученные результаты, характеризующие частоту выявления различных геновариантов и аллелей среди обследованных пациентов, представлены в таблице 2.

Табл. 2. Результаты выявления полиморфных вариантов генов-кандидатов (*OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *CYP3A5*, *AGT*) у пациентов с АГ и избыточной массой тела (n=79)

Ген	Генотип	Распространённость признака	
		n	%
<i>OLR1</i>	CC	26	32,91
	CT	27	34,18
	TT	26	32,91
	C	79	50,00
	T	79	50,00
<i>ADD1</i>	GG	58	73,42
	GT	19	24,05
	TT	2	2,53
	G	135	85,44
	T	23	14,56
<i>SOD2</i>	CC	28	35,44
	CT	28	35,44
	TT	23	29,11
	C	84	53,16
	T	74	46,84
<i>VEGFA</i>	CC	20	25,32
	CA	41	51,90
	AA	18	22,78
	C	81	51,27
	A	77	48,73
<i>AGT</i>	CC	45	56,96
	CT	30	37,97
	TT	4	5,06
	C	120	75,95
	T	38	24,05
<i>CYP3A5</i>	GG	53	67,09
	GA	14	17,72
	AA	12	15,19
	G	120	75,95
	A	38	24,05

У обследованных пациентов с АГ и избыточной массой тела в ходе идентификации полиморфных вариантов для генов *ADD1*, *CYP3A5*, *AGT* было установлено доминирование диких аллелей (более 75 %) и диких геновариантов (более 50 %); для генов *OLR1* и *SOD2* было выявлено эквивалентное соотношение дикого и мутантного аллелей (~ по 50 % каждого аллеля), а также гомозиготных и гетерозиготных геновариантов (~ по 30 % дикого, гетерозиготного и мутантного); для гена *VEGFA* соотношение дикого и мутантного аллелей было эквивалентным (51,27 %/48,73 %), а в качестве доминирующего геноварианта выступала гетерозигота (51,90 %).

В ходе анализа полученных данных проводили выявление ассоциаций полиморфизмов в генах-кандидатах (*OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *CYP3A5*, *AGT*) с развитием сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с АГ и избыточной массой тела. В группах пациентов с сердечно-сосудистыми осложнениями (n=53) и без сердечно-сосудистых осложнений (n=26) с применением критерия χ^2 -Пирсона было установлено наличие статистически значимых различий в частоте выявления полиморфных вариантов гена *CYP3A5*, причем как для дикого (GG), гетерозиготного (GA) и мутантного (AA) геновариантов ($\chi^2=14,49$, $p=0,001$), так и для дикого (G) и мутантного (A) аллелей ($\chi^2=17,28$, $p<0,001$) (таблица 3). Необходимо отметить, что мутантный аллель и мутантный геновариант AA достоверно чаще встречались у пациентов без сердечно-сосудистых осложнений.

Табл. 3. Результаты выявления полиморфных вариантов генов-кандидатов (*OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *CYP3A5*, *AGT*) в группах пациентов с и без сердечно-сосудистых осложнений (n=79)

Ген	Генотип	Распространённость признака				Значения χ^2 , p
		Пациенты с сердечно-сосудистыми осложнениями (n=53)		Пациенты без сердечно-сосудистых осложнений (n=26)		
		n	%	n	%	
OLR1	CC	14	26,42	12	46,15	$\chi^2=3,08, p=0,21$
	CT	20	37,74	7	26,92	
	TT	19	35,85	7	26,92	
	C	48	45,28	31	59,62	$\chi^2=3,55, p=0,06$
	T	58	54,72	21	40,38	
ADD1	GG	39	73,58	19	73,08	$\chi^2=0,28, p=0,87$
	GT	13	24,53	6	23,08	
	TT	1	1,89	1	3,85	
	G	91	85,85	44	84,62	$\chi^2=0,19, p=0,91$
	T	15	14,15	8	15,38	
SOD2	CC	16	30,19	12	46,15	$\chi^2=2,56, p=0,28$
	CT	19	35,85	9	34,62	
	TT	18	33,96	5	19,23	
	C	51	48,11	33	63,46	$\chi^2=3,30, p=0,069$
	T	55	51,89	19	36,54	
VEGFA	CC	15	28,30	5	19,23	$\chi^2=0,88, p=0,64$
	CA	27	50,94	14	53,85	
	AA	11	20,75	7	26,92	
	C	57	53,77	24	46,15	$\chi^2=1,29, p=0,26$
	A	49	46,23	28	53,85	
AGT	CC	28	52,83	17	65,38	$\chi^2=1,13, p=0,57$
	CT	22	41,51	8	30,77	
	TT	3	5,66	1	3,85	
	C	78	73,58	42	80,77	$\chi^2=1,32, p=0,38$
	T	28	26,42	10	19,23	
CYP3A5	GG	43	81,13	10	38,46	$\chi^2=14,49, p=0,001$
	GA	5	9,43	9	34,62	
	AA	5	9,43	7	26,92	
	G	91	85,85	29	55,77	$\chi^2=17,28, p<0,001$

Для других изученных полиморфизмов в генах *OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *AGT* не было выявлено достоверных отличий распространенности различных геновариантов в группах пациентов с сердечно-сосудистыми осложнениями и без сердечно-сосудистых осложнений ($p>0,05$).

Среди пациентов с фибрилляцией предсердий (n=34) и без фибрилляции предсердий (n=45) с применением критерия χ^2 -Пирсона для гена *CYP3A5* также было установлено наличие статистически значимых различий в частоте выявления различных геновариантов ($\chi^2=10,77$, $p=0,005$), а также дикого (G) и мутантного (A) аллелей ($\chi^2=7,65$, $p=0,006$) (таблица 4). Мутантный аллель A достоверно чаще встречался у пациентов без фибрилляции предсердий, доминирующим геновариантом у пациентов данной группы был гетерозиготный GA-генотип.

Табл. 4. Результаты выявления полиморфных вариантов генов-кандидатов (*OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *CYP3A5*, *AGT*) в группах пациентов с и без фибрилляции предсердий (n=79)

Ген	Генотип	Распространённость признака				Значения χ^2 , p
		Пациенты без фибрилляции предсердий (n=45)		Пациенты с фибрилляцией предсердий (n=34)		
		п	%	п	%	
OLR1	CC	16	35,56	10	29,41	$\chi^2=0,51$, $p=0,77$
	CT	14	31,11	13	38,24	
	TT	15	33,33	11	32,35	
	C	46	51,11	33	48,53	$\chi^2=0,35$, $p=0,86$
	T	44	48,89	35	51,47	

Продолжение таблицы 4

ADD1	GG	33	73,33	25	73,53	$\chi^2=0,046, p=0,98$
	GT	11	24,44	8	23,53	
	TT	1	2,22	1	2,94	
	G	77	85,56	58	85,29	$\chi^2=0,033, p=0,98$
	T	13	14,44	10	14,71	
SOD2	CC	17	37,78	11	32,35	$\chi^2=1,11, p=0,58$
	CT	17	37,78	11	32,35	
	TT	11	24,44	12	35,29	
	C	51	56,67	33	48,53	$\chi^2=1,24, p=0,61$
	T	39	43,33	35	51,47	
VEGFA	CC	9	20,00	11	32,35	$\chi^2=1,32, p=0,52$
	CA	26	57,78	15	44,12	
	AA	10	22,22	8	23,53	
	C	44	48,89	37	54,41	$\chi^2=0,62, p=0,43$
	A	46	51,11	31	45,59	
AGT	CC	26	57,78	19	55,88	$\chi^2=0,09, p=0,96$
	CT	17	37,78	13	38,24	
	TT	2	4,44	2	5,88	
	C	69	76,67	51	75,00	$\chi^2=0,11, p=0,87$
	T	21	23,33	17	25,00	
CYP3A5	GG	24	53,33	29	85,29	$\chi^2=10,77, p=0,005$
	GA	13	28,89	1	2,94	
	AA	8	17,78	4	11,76	
	G	61	67,78	59	86,76	$\chi^2=7,65, p=0,006$
	A	29	32,22	9	13,24	

При изучении частоты встречаемости полиморфизмов в других генах-кандидатах *OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *AGT* не было выявлено достоверных отличий в распространенности различных геновариантов в группах пациентов с фибрилляцией предсердий и без фибрилляции предсердий ($p>0,05$).

Анализ результатов полученных для групп пациентов с ИБС ($n=51$) и без ИБС ($n=28$) позволил установить наличие статистически значимого увеличения частоты выявления мутантного аллеля Т в гене *OLR1* у пациентов, страдающих ИБС ($\chi^2=3,98, p=0,046$) (таблица 5).

Табл. 5. Результаты выявления полиморфных вариантов генов-кандидатов (*OLR1*, *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *CYP3A5*, *AGT*) в группах пациентов с ИБС и без ИБС ($n=79$)

Ген	Генотип	Распространённость признака				Значения χ^2, p
		Пациенты без ИБС, (n=28)		Пациенты с ИБС, (n=51)		
		n	%	n	%	
OLR1	CC	13	46,43	13	25,49	$\chi^2=3,62, p=0,16$
	CT	8	28,57	19	37,25	
	TT	7	25,00	19	37,25	
	C	34	60,71	45	44,12	$\chi^2=3,98, p=0,046$
	T	22	39,29	57	55,88	
ADD1	GG	19	67,86	39	76,47	$\chi^2=0,74, p=0,69$
	GT	8	28,57	11	21,57	
	TT	1	3,57	1	1,96	
	G	46	82,14	89	87,25	$\chi^2=0,58, p=0,71$
	T	10	17,86	13	12,75	
SOD2	CC	12	42,86	16	31,37	$\chi^2=1,55, p=0,46$
	CT	10	35,71	18	35,29	
	TT	6	21,43	17	33,33	
	C	34	60,71	50	49,02	$\chi^2=0,96, p=0,32$
	T	22	39,29	52	50,98	
VEGFA	CC	5	17,86	15	29,41	$\chi^2=1,28, p=0,53$
	CA	16	57,14	25	49,02	
	AA	7	25,00	11	21,57	
	C	26	46,43	55	53,92	$\chi^2=1,07, p=0,38$
	A	30	53,57	47	46,08	

Продолжение таблицы 5

AGT	CC	17	60,71	28	54,90	$\chi^2=0,36, p=0,84$
	CT	10	35,71	20	39,22	
	TT	1	3,57	3	5,88	
	C	44	78,57	76	74,51	$\chi^2=0,99, p=0,52$
	T	12	21,43	26	25,49	
CYP3A5	GG	12	42,86	41	80,39	$\chi^2=11,63, p=0,003$
	GA	9	32,14	5	9,80	
	AA	7	25,00	5	9,80	
	G	33	58,93	87	85,29	$\chi^2=13,76, p<0,001$
	A	23	41,07	15	14,71	

Для гена *CYP3A5* было выявлено достоверное увеличение распространенности мутантного (А) аллеля ($\chi^2=13,76, p<0,001$) в группе пациентов без ИБС. Частота выявления мутантного АА и гетерозиготного GA генотипов, также была достоверно выше в группе пациентов без ИБС ($\chi^2=11,63, p=0,003$). При изучении полиморфизмов в генах *ADD1*, *SOD2*, *VEGFA*, *AGT* не было выявлено достоверных отличий в распространенности различных геновариантов в группах пациентов с ИБС и без ИБС ($p>0,05$).

В ходе анализа результатов, полученных для групп пациентов, разделенных в зависимости от стадии ХСН (ХСН 0-1 стадии (n=50) и ХСН 2А и 2Б стадии (n=29)), было установлено наличие статистически значимых различий в частоте выявления дикого (С) и мутантного (Т) аллелей ($\chi^2=6,97, p=0,008$) в гене *OLR1* (таблица 6). Увеличение частоты мутантного аллеля было зафиксировано для пациентов с ХСН 2А и 2Б стадии.

Табл. 6. Результаты выявления полиморфных вариантов гена *OLR1* у пациентов с АГ и избыточной массой тела в подгруппах с ХСН 2А-2Б стадии и ХСН 0-1 стадии (n=79)

Ген	Генотип	Распространённость признака				Значения χ^2, p
		Пациенты ХСН-0-1 (n=50)		Пациенты с ХСН-2А-2Б (n=29)		
		n	%	n	%	
OLR1	CC	21	42,00	5	17,24	$\chi^2=5,58, p=0,06$
	CT	16	32,00	11	37,93	
	TT	13	26,00	13	44,83	
	C	58	58,00	21	36,21	$\chi^2=6,97, p=0,008$
	T	42	42,00	37	63,79	
ADD1	GG	33	66,00	25	86,21	$\chi^2=4,18, p=0,12$
	GT	15	30,00	4	13,79	
	TT	2	4,00	0	0,00	
	G	81	81,00	54	93,10	$\chi^2=4,32, p=0,038$
	T	19	19,00	4	6,90	
SOD2	CC	16	32,00	12	41,38	$\chi^2=0,74, p=0,69$
	CT	19	38,00	9	31,03	
	TT	15	30,00	8	27,59	
	C	51	51,00	33	56,90	$\chi^2=1,21, p=0,64$
	T	49	49,00	25	43,10	
VEGFA	CC	12	24,00	8	27,59	$\chi^2=2,44, p=0,29$
	CA	29	58,00	12	41,38	
	AA	9	18,00	9	31,03	
	C	53	53,00	28	48,28	$\chi^2=0,97, p=0,45$
	A	47	47,00	30	51,72	
AGT	CC	30	60,00	15	51,72	$\chi^2=0,67, p=0,72$
	CT	18	36,00	12	41,38	
	TT	2	4,00	2	6,90	
	C	78	78,00	42	72,41	$\chi^2=1,14, p=0,32$
	T	22	22,00	16	27,59	
CYP3A5	GG	30	60,00	23	79,31	$\chi^2=3,49, p=0,17$
	GA	10	20,00	4	13,79	
	AA	10	20,00	2	6,90	
	G	70	70,00	50	86,21	$\chi^2=5,28, p=0,022$
	A	30	30,00	8	13,79	

Наличие статистически значимых различий в частоте выявления дикого (G) и мутантного (T) аллелей ($\chi^2=4,32$, $p=0,038$) было установлено для гена *ADD1*. Частота мутантного аллеля была выше в группе пациентов с ХСН 0-1 стадии. Для гена *CYP3A5* было также выявлено достоверное увеличение частоты мутантного аллеля А в группе пациентов с ХСН 0-1 стадии.

Ген *OLR1* кодирует принадлежащий к суперсемейству лектинов С-типа рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Регуляция активности данного гена происходит посредством сигнального пути циклического АМФ. Кодированный белок связывает, интернализует и расщепляет окисленные ЛПНП, а также принимает участие в регуляции Fas-индуцированного апоптоза [16, 18]. Еще одним видом биологической активности окисленных ЛПНП является формирование эндотелиальной дисфункции при их связывании с рецептором *OLR1* в эндотелиальных клетках, что приводит к активации выработки молекул адгезии лейкоцитов, хемокинов, эндотелина-1 и супероксидного аниона, а также уменьшает высвобождение оксида азота. Структура и уровень экспрессии рецептора *OLR1* оказывают непосредственное влияние на активность прогрессирования процесса атерогенеза. В свою очередь, атеросклероз является фундаментальным звеном патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний [3].

В ходе проведенного исследования среди пациентов с АГ и избыточной массой тела в ходе идентификации полиморфизма C1073T (rs1050283) в гене *OLR1* было выявлено достоверное увеличение частоты мутантного Т аллеля у пациентов с ИБС ($\chi^2=3,98$, $p=0,046$) и у пациентов с ХСН 2А и 2Б стадии ($\chi^2=6,97$, $p=0,008$). Таким образом, для пациентов, являющихся носителями мутантного аллеля в гене *OLR1* возрастает риска развития данных патологических состояний.

Аддуцины – семейство белков цитоскелета, кодируемых тремя генами (*ADD1* – α -субъединица, *ADD2* – β -субъединица и *ADD3* – γ -субъединица). Аддуцин представляет собой гетеродимерный белок, обладающий высоким сродством к Ca^{2+} /кальмодулину, являющийся субстратом для протеинкиназ А и С, участвующий в межклеточном контакте, передаче сигналов и транспорте ионов через клеточную мембрану [2, 8].

В 1997 году Cusi и соавт. впервые описали генетический вариант, при котором замена одного нуклеотида (G1378T) в гене α -аддуцина 1 (*ADD1*), приводила к замене аминокислоты глицина (Gly) на триптофан (Trp) в 460 положении (Gly460Trp). Было установлено, что такая модификация аминокислотной последовательности (Gly460Trp) изменяет транспорт ионов, приводя к увеличению активности Na^+/K^+ -АТФазы, усилению реабсорбции натрия в проксимальных почечных канальцах и повышению АД [1].

Результаты изучения ассоциации полиморфизма гена *ADD1* с повышенным риском развития АГ не однозначны, так в ряде исследований была выявлена достоверная связь между присутствием мутантного аллеля Т в гене *ADD1* и развитием АГ [9, 13], однако, в других исследованиях результаты были противоположными [5, 11].

У пациентов с АГ и избыточной массой тела, включенных в данное исследование, при идентификации полиморфизма G1378T (Gly460Trp, rs4961) в гене *ADD1* было выявлено достоверное увеличение частоты мутантного Т аллеля у пациентов с отсутствием ХСН или ХСН 1 стадии, увеличение частоты мутантного аллеля в данной группе пациентов происходило за счет увеличения частоты гетерозиготного генотипа GT. Вероятно данный геновариант (GT) способен оказывать протективное действие и способствовать снижению риска прогрессирования ХСН.

Ген *CYP3A5* является частью кластера генов цитохрома P450 на хромосоме 7q21.1. Однонуклеотидный полиморфизм G6986A (rs776746) в интроне 3 гена *CYP3A5* имеет функциональное значение, т.к. оказывает влияние на сплайсинг транскриптов, этот геновариант известен как *CYP3A5*3* [13–15].

Этот ген кодирует белок, входящий в состав членов суперсемейства ферментов цитохрома P450, которые катализируют реакции метаболизма ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств, а также процессы синтеза холестерина, стероидов и других липидов. Белок *CYP3A5* участвует в метаболизме лекарственных средств, стероидных гормонов, таких как тестостерон и прогестерон. Полиморфизм G6986A в гене *CYP3A5* приводит к aberrantному сплайсингу мРНК и, как следствие, к синтезу нефункционального белка. Соответственно, носители двойного мутантного аллеля AA являются плохими метаболизаторами субстратов фермента *CYP3A5*, носители гетерозиготного аллеля GA являются промежуточными метаболизаторами, а пациенты с диким генотипом GG являются нормальными метаболизаторами. По данным литературных источников этот полиморфизм связан с АГ и нестабильностью атеросклеротических бляшек среди представителей азиатской популяции [6, 7, 10]

В ходе проведенного исследования у пациентов с АГ и избыточной массой тела мутантный аллель полиморфизма G6986A (rs776746) в гене *CYP3A5* был ассоциирован со снижением риска развития как сердечно-сосудистых осложнений в целом ($\chi^2=17,28$, $p<0,001$), так и отдельно по каждому виду осложнений: фибрилляция предсердий ($\chi^2=7,65$, $p=0,006$), ИБС ($\chi^2=13,76$, $p<0,001$), ХСН 2А-2Б стадий ($\chi^2=5,28$, $p=0,022$). Увеличение частоты мутантного аллеля и мутантного (АА) и гетерозиготного (GA) геновариантов у пациентов без сердечно-сосудистых осложнений, можно рассматривать, как протективное влияние мутантных аллелей гена *CYP3A5* на риск возникновения и прогрессирования таких патологических состояний как фибрилляция предсердий, ИБС, ХСН 2А-2Б стадий, у пациентов с АГ и избыточной массой тела, за счет снижения активности фермента, обеспечивающего метаболизм лекарственных средств и более длительного поддержания их терапевтических концентраций в организме пациентов.

Заключение. АГ относят к многофакторным заболеваниям, которые ассоциированы как с наследственными, так и со средовыми факторами. Для оценки вклада в развитие и прогрессирование заболевания индивидуальных генетических особенностей (полиморфизмов, мутаций и др.) проводятся активные исследования. При этом все исследователи, изучающие генетические маркеры АГ и сердечно-сосудистых осложнений, возникающих на ее фоне, подчеркивают, что эти ассоциации могут различаться в разных этнических группах, поэтому необходимо проводить исследования генетических особенностей в конкретной популяции перед установлением факторов риска для возникновения и прогрессирования заболевания и его осложнений.

В результате анализа данных, полученных с использованием биологического материала пациентов с АГ и избыточной массой тела, включенных в данное исследование, было установлено, что присутствие мутантного Т аллеля (rs1050283) в гене *OLR1* ассоциировано с риском развития ИБС и риском прогрессирования ХСН. Для мутантного Т аллеля в составе гетерозиготного генотипа GT в гене *ADD1* (rs4961) установлена ассоциация со снижением риска прогрессирования ХСН. Полиморфизм G6986A (rs776746) в гене *CYP3A5* был ассоциирован со снижением риска развития всех изученных сердечно-сосудистых осложнений. Дальнейшие исследования на более широкой выборке пациентов позволят сформировать более четкие критерии и вклад каждого из них в риск развития сердечно-сосудистых осложнений.

Литература:

- [1] Cusi D., Barlassina C., Azzani T. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension // *Lancet*. 1997. Vol. 349. P. 1353–1357.
- [2] Gonzalez-Fernandez E, Fan L, Wang S, et al. The adducin saga: pleiotropic genomic targets for precision medicine in human hypertension-vascular, renal, and cognitive diseases // *Physiol Genomics*. 2022. Vol. 54. N. 2. P. 58–70.
- [3] Guo X., Xiang Y., Yang H., Yu L., Peng X., Guo R. Association of the LOX-1 rs1050283 Polymorphism with Risk for Atherosclerotic Cerebral Infarction and its Effect on sLOX-1 and LOX-1 Expression in a Chinese Population // *J Atheroscler Thromb*. 2017. Vol. 24. N 6. P. 572–582.
- [4] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension> [Электронный ресурс], дата доступа 09.04.2024
- [5] Ishikawa K., Katsuya T., Sato N. No association between α -adducin 460 polymorphism and essential hypertension in a Japanese population // *American Journal of Hypertension*. 1998. Vol. 11. P. 502–506.
- [6] Kreutz R., Zuurman M., Kain S. The role of the cytochrome P450 3A5 enzyme for blood pressure regulation in the general Caucasian population // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005. Vol. 15. P. 831–837
- [7] Kuehl P., Zhang J., Lin Y. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression // *Nat Genet*. 2001. Vol. 27. N. 4. P. 383–391.
- [8] Mills K.T., Bundy J.D., Kelly T.N. Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries // *Circulation*. 2016. Vol. 134. p. 441–450.
- [9] Nakamura Y., Tabara Y., Miki T. Both angiotensinogen M235T and α -adducin G460W polymorphisms are associated with hypertension in the Japanese population // *Journal of Human Hypertension*. 2007. Vol. 21. P. 253–255.
- [10] Naushad R., Arif H., Yogesh K.C. Association between urinary 6 β -hydroxycortisol/cortisol ratio and CYP3A5 genotypes in a normotensive population // *Exp Ther Med*. 2013. Vol. 5. N. 2. P. 527–532.
- [11] Ramu P., Umamaheswaran G., Shewade D. G. Gly460Trp polymorphism of the ADD1 gene and essential hypertension in an Indian population: a meta-analysis on hypertension risk // *Indian Journal of Human Genetics*. 2010. Vol. 16. P. 8–15.
- [12] Roth G.A., Huffman M.D., Moran A.E. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013 // *Circulation*. 2015. Vol. 132. P. 1667–1678.
- [13] Soualmia H., Ben Romdhane A., Midani F. Alpha adducin G460T variant is a risk factor for hypertension in tunisian population // *Clinical Laboratory*. 2016. Vol. 62. N. 5. P. 765–770.

- [14]Shao M., Mao Y., Hong Q., Jin X., Cai H., Yi X. CYP metabolic pathway related gene polymorphism increases the risk of embolic and atherothrombotic stroke and vulnerable carotid plaque in southeast China // J Stroke Cerebrovasc Dis. 2023 Vol. 32. N. 8. P. 107195.
- [15]Tanaka R., Suzuki Y., Watanabe H. Association of CYP3A5 polymorphisms and parathyroid hormone with blood level of tacrolimus in patients with end-stage renal disease // Clin Transl Sci. 2021. Vol. 14. N. 5P. 2034-2042.
- [16]Tatsuguchi M., Furutani M., Hinagata J. Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction, // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003. Vol. 303, N. 1. P. 247–250.
- [17]Zhou B., Perel P., Mensah G.A. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension // Nat Rev Cardiol. 2021. Vol. 18. P. 785–802.
- [18]Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Черешнев В.А. Физиологическая и патогенетическая роль рецепторов-мусорщиков у человека // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22. №. 1. С. 37–48.

T. V. RUDENKOVA, S. A. KOSTIUK, M. V. SHTONDA, T. V. AKOLA

MOLECULAR GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH THE RISK OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND OVERWEIGHT

Educational Institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

Summary

The development of arterial hypertension and cardiovascular complications are associated with both environmental factors and individual genetic characteristics. The study examined associations of polymorphisms in the *OLR1*, *ADD2*, *SOD2*, *VEGF-A*, *AGT*, *CYP3A5* genes with the risk of cardiovascular complications evolution in patients with arterial hypertension and overweight. It has been established that the presence of the mutant T allele (rs1050283) in the *OLR1* gene is associated with the risk of developing coronary heart disease and the risk of chronic heart failure progression. For the mutant T allele as part of the heterozygous GT genotype in the *ADD1* gene (rs4961), an association with a reduced risk of progression of chronic heart failure was established. Polymorphism G6986A (rs776746) in the *CYP3A5* gene was associated with a reduced risk of developing all studied cardiovascular complications (atrial fibrillation, coronary heart disease, progression of chronic heart failure). Further studies on a larger sample of patients will allow us to formulate more clear criteria and the contribution of each polymorphism to the risk of developing cardiovascular complications in patients with arterial hypertension and overweight.

Key words: arterial hypertension, overweight, cardiovascular complications, polymorphisms.

УДК 615.83(476)

Н. Д. ТИТКОВА¹, С. В. ГУБКИН¹, С. Б. КОХАН¹, О. Е. ПОЛУЛЯХ¹,
С. В. МИХАЛЬЧИК², В. В. КОРОТКИЙ²

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОЗДОРОВЛЕНИЯ САНАТОРНО-КУРОРТНОЙ МЕСТНОСТИ НА ОТДЫХАЮЩИХ В ДУП «САНАТОРИЙ КРИНИЦА»

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Дочернее унитарное предприятий «Санаторий Криница», Ждановичи, Республика Беларусь

Санаторно-курортное оздоровление и лечение населения является актуальным направлением изучения физиологических особенностей человека, находящегося в условиях санаторно-курортной местности. Средствами немедикаментозного лечения выступают факторы оздоровления, имеющие преимущество перед лекарственной терапией, улучшающие эффективность лечебно-оздоравливающих мероприятий в условиях санатория. Концепция государственной политики развития здравниц предусматривает создание комплексных программ оздоровления и медицинской реабилитации с использованием природно-лечебного потенциала территорий санаторно-курортных организаций. В статье приводятся результаты исследования влияния факторов оздоровления санаторно-курортной местности ДУП «Санаторий Криница» на электрофизиологические параметры сердца, кислотно-основное состояние и газы крови, а также биохимические показатели у отдыхающих.

Ключевые слова: санаторно-курортная организации (СКО), санаторно-курортная местность (СКМ), ДУП «Санаторий Криница», природный ресурсный потенциал, стресс-индекс (SI), показатель активности регуляторных систем (ПАРС).

Введение. Санаторно-курортное оздоровление и лечение улучшает эффективность профилактических и лечебно-оздоровительных мероприятий у отдыхающих с целью восстановления функциональных возможностей организма человека и повышения качества жизни населения. Ведущая роль принадлежит природному лечебному потенциалу санаторно-курортной местности [1, 2]. Под природным лечебным потенциалом санаторно-курортной местности понимается совокупность всех видов ресурсов и условий, которые могут быть использованы в процессе оказания услуг по санаторно-курортному лечению и оздоровлению, прогнозируемому строительству здравниц в благоприятных условиях местности [3].

Цель исследования: оценить влияние факторов оздоровления санаторно-курортной местности на отдыхающих в условиях санатория «Криница».

Дочернее унитарное предприятие «Санаторий Криница» (далее санаторий «Криница») расположен на берегу водохранилища Криница и Дрозды на территории курорта Ждановичи в Минском районе, Минской области. Площадь санаторно-курортной местности составляет 22 га. Годом основания здравницы считается 1961 г. Медико-климатическая характеристика: среднегодовая температура – +5,4 °С, солнечная инсоляция – 1800–1850 часов в году, влажность воздуха – 55–65 %, дни со штилем возрастают от зимы к лету – от 4 % до 12 % дней; вода среднеминерализованная (11,5 г/дм³) хлоридно-сульфатная натриевая используется для лечебных целей; ландшафты холмисто-волнистые с моренными грядами, сосновыми широколиственно-сосново-еловыми лесами; грязелечение – сапропелевые грязи оз. Судобль) [3, 4]. Санаторий «Криница» прошел государственную аттестацию санаторно-курортных и оздоровительных организаций – санаторий высшей медицинской категории. В условиях санаторно-курортная организации (СКО) выполняется широкий комплекс услуг по оздоровлению и лечению: методы функциональной и лабораторной диагностики, аэротерапия, гелиотерапия, дасотерапия, ароматерапия, имеются бювет с минеральной водой, вакуум-терапия, ванны: сухая углекислая, гидромассажная, жемчужная, минеральные, скипидарные, криотерапия и др.

Материалы и методы исследования. Исследование лиц, проходящих санаторно-курортное лечение и оздоровление в условиях санатория «Криница» проводилось с общего осмотра, обследования и анкетного опроса. Антропометрическое обследование, включало измерение массы

тела (кг) и роста (м). Все линейные размеры определяли с точностью до 0,5 см, массу тела – до 0,1 кг, для чего использовали модифицированный ростомер и стандартные антропометрические инструменты – диагностические весы «Tanita». Наличие и степень ожирения определяли путем расчета индекса массы тела (ИМТ), как отношение массы тела (кг) к росту (см) в квадрате (см²/кг). Измерения частоты сердечных сокращений (ЧСС) и артериального давления (АД) проводились с использованием автоматического прибора для измерения артериального давления и частоты пульса «Microlife» (Швейцария). Уровень сатурации определяли с помощью пульсоксиметра Nellcor SpO2.

Исследование показателя активности регуляторных систем (ПАРС) организма проводилось с использованием аппаратно-программного комплекса «ЭКОСАН» (программа «Кардиовизор») до начала и перед отъездом из санатория Криница. Для оценки состояния миокарда у 20 отдыхающих исследовались дисперсионные характеристики миокарда компьютерной системой скрининга сердца «Кардиовизор-06с».

Забор крови из вены для определения биохимических показателей, кислотно-основного состояния и газов крови проводили в утреннее время натощак, в 8–10 ч. утра. Биохимические исследования сыворотки венозной крови выполняли с использованием наборов производства компании Diasens (Республика Беларусь) на биохимическом анализаторе BS-200 (Китай).

Нормальность распределения определяли с использованием критерия Шапиро-Уилко (Statistica 7.0). По критериям «Возраст», «ИМТ», «ЧСС», «САД», «ДАД», «SpO₂» распределение носило нормальный характер. Данные выражали в виде средних величин и стандартного отклонения ($\bar{X} \pm SD$). Для оценки различий между группами использовали t-критерий Стьюдента для зависимых выборок. В исследование принимало участие 20 лиц, проходящих санаторно-курортное лечение и оздоровление в санатории «Криница», 12 мужчин и 8 женщин, в возрасте от 39 до 61 года.

Результаты и их обсуждение. Электрофизиологические дисперсионные характеристики. Распределение по показателям «Миокард», «Ритм», «Стресс-индекс» не носило нормального характера, использовали непараметрические методы статистики. Данные представлены в виде медиан и процентилей (Me (25;75)). Для оценки различий между зависимыми выборками использовали t-критерий Вилкоксона. По показателю «Пульс» – характер распределения данных нормальный. Использовали параметрические методы статистики (данные в виде $\bar{X} \pm SD$).

Табл. 1. Результаты исследования электрофизиологических дисперсионных характеристик

Показатели	До оздоровления и лечения (n=20)	После оздоровления и лечения (n=20)
Миокард, %	15 (14;24)	15 (12;18)
Ритм, %	15 (9;44)	33 (11;41)
Пульс, уд/мин	72±13	71±11
Стресс-индекс (SI), у.е.	115 (38;291)	77 (23;141)*
Показатель активности регуляторных систем (ПАРС)	5 (3;7)	5 (3;6)

Результаты исследования электрофизиологических дисперсионных характеристик показали, что при оздоровлении в санаторно-курортных условиях способствует снижению индекса напряженности регуляторных систем (Стресс-индекс, SI), который характеризует баланс симпатической и парасимпатической систем регуляции 77 (23;141). У 47 % отдыхающих стресс-индекс был ниже референсных норм, у 33 % – выше нормы. После санаторно-курортного лечения стресс-индекс у большинства отдыхающих нормализовался, оставаясь ниже нормы только у 27 % лиц. Показатель чувствителен к усилению тонуса симпатической нервной системы. Небольшая нагрузка (физическая или эмоциональная) увеличивает его в 1,5–2 раза. При значительных нагрузках он растет в 5–10 раз. Несомненно, преимущество санаторно-курортного лечения и оздоровления перед поликлиническим является нахождение отдыхающего в условиях санатория и отвлечение его от повседневных бытовых, стрессовых ситуаций, создание вокруг него заботливой и спокойной атмосферы [5–8].

Табл. 2. Результаты исследования биохимического анализа

Показатели	До оздоровления и лечения (n=20)	После оздоровления и лечения (n=20)
Общий белок, г/л	68 (67;70)	66 (66;70)
Мочевина, ммоль/л	5,3 (4,3;5,9)	5,3 (4,2;7,2)
Креатинин, мкмоль/л	90,7 (78,0;105,5)	84,5 (72,0;103,0)
Холестерин, ммоль/л	4,86 (3,99;5,96)	4,65 (4,05; 5,46)
ЛПВП, ммоль/л	1,38 (1,24;1,78)	1,46 (1,23;1,60)

Продолжение таблицы 2

ЛПНП, ммоль/л	2,71 (2,07;3,34)	2,56 (2,10;3,20)
КА	2,2 (1,8;2,8)	2,3 (1,7;2,9)
Триглицериды, ммоль/л	1,04 (0,70; 1,64)	0,99 (0,63;1,21)*
Билирубин общий, мкмоль/л	11 (9;14)	10 (8;12)
Амилаза, Ед/л	54 (47;69)	55 (47;69)
Глюкоза, ммоль/л	5,4 (4,7;5,8)	5,3 (5,1;6,0)
Щелочная фосфатаза, Ед/л	145 (130;178)	147 (134;166)
ГГТ, Ед/л	21 (16;32)	24 (17;31)
АЛТ, Ед/л	25 (21;31)	28 (22;35)
АСТ, Ед/л	27 (22;31)	27 (25;32)
КФК, Ед/л	98 (73;143)	110 (81;150)
ЛДГ, Ед/л	301 (269;328)	308 (273;329)
Железо, мкмоль/л	20,5 (16,9;25,9)	16,6 (14,1;22,2)
Ферритин, мкг/л	66 (29;112)	75 (25;133)
Инсулин, мкМЕ/мл	10,4 (7,6;13,2)	9,2 (7,8;19,1)
Индекс НОМА	2,4 (1,8;3,2)	2,3(1,8;5,4)

Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$

Определение биохимических маркеров в сыворотке крови не выявило достоверных отличий до и после оздоровления в условиях СКМ санатория «Криница», наблюдается снижение уровня триглицеридов с 1,04 (0,70;1,64) до 0,99 (0,63;1,21), что свидетельствует о правильном сбалансированном питании в здравнице и рациональном оказании услуг по санаторно-курортному лечению и оздоровлению.

Табл. 3. Результаты исследования кислотно-основного состояния и газов в крови

Показатели	До оздоровления и лечения (n=20)	После оздоровления и лечения (n=20)
pH	7,4 (7,3;7,4)	7,4 (7,3;7,4)
pCO ₂ , мм рт ст	48,1 (42,8;51,4)	48,7 (44,4;53,0)
pO ₂ , мм рт ст	37,9 (33,1;52,8)	31,9 (24,7;41,1)*
ctHb, г/л	14,1 (13,5;15,7)	15,7 (13,9;16,5)*
sO ₂ , %	73,8 (61,7;87,2)	57,8 (39,2;76,3)*
FO ₂ Hb, %	73 (59,3;85,9)	57,1 (38,7;74,5)*
FCOHb, %	0,8 (0,6;1,2)	0,8 (0,5;1,5)
FHHb, %	25,9 (12,8;36,8)	40,8 (23,1;60,0)*
FMet Hb, %	0,9 (0,9;1,1)	0,9 (0,8;1,2)
cLac, ммоль/л	2,0 (1,7;3,2)	2,1 (1,8;3,2)
mOsm, ммоль/кг	279,2 (277,3;280,1)	276,7 (268,8;279)
cBase, c	1,9 (-0,5;2,8)	1,7 (0,4;3,8)
cHCO ₃ ⁻ , ммоль/л	24,5 (23,7;25,7)	24,8 (23,7;25,7)
ABE, ммоль/л	1,3 (-0,5;2,1)	0,8 (0;2,8)

Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$

Результаты исследования кислотно-основного состояния и газов венозной крови показали, что изучаемые параметры до и после санаторно-курортного лечения соответствовали значениям нормы. Однако у лиц, прошедших курс оздоровления в санатории отмечено статистически значимое снижение насыщения гемоглобина кислородом (sO₂), парциального давления кислорода в крови (pO₂) и фракции оксигемоглобина (FO₂Hb), а также повышение содержания общего гемоглобина и фракции дезоксигемоглобина (FHHb) в венозной крови ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют об усилении поглощения кислорода тканями организма после оздоровления и лечения в условиях здравницы, благодаря комплексу оказанных услуг (климатотерапия: гелиотерапия, аэротерапия, дасотерапия; ингаляции, минеральные ванны, лечебная физкультура и др.).

После курса оздоровления и отдыха в условиях СКМ санатория «Криница» с комплексом назначений услуг (аэротерапия, гелиотерапия, дасотерапия, ингаляции, сухие углекислые ванны, ванны с минеральной водой и др.) показатель «Миокард» снизился у 6 обследуемых (60 %) «Миокард» уменьшилось с 25 (12;35) % до 18 (11;22) %, что подтверждает объективным анализом дисперсионного картирования миокарда.

Заключение. В условиях СКО нормализуется уровень жизнедеятельности организма под влиянием факторов оздоровления (природный ресурсный, медико-диагностический,

социокультурный потенциалы). Это изменение является следствием взаимосвязанных и взаимообусловленных фаз: сложнорефлекторной, нервно-химической и фазы последствия. Решающее значение в формировании ответных реакций на воздействие условий СКМ является исходное состояние организма (до лечения). Степень реакции организма на санаторно-курортное лечение и оздоровление зависит от состояния организма. Здоровый организм реагирует мало, а больной или усталый организм отвечает на факторы оздоровления более сильной реакцией. При анализе влияния факторов оздоровления в условиях санатория «Криница» на здоровье лиц, проходящих санаторно-курортное лечение и оздоровление установлено, что здравница обладает богатым природным лечебным потенциалом и в комплексе с оказанным лечением влияет на насыщение кислородом венозной крови и доставке его к тканям, способствует снижению индекса напряженности регуляторных систем и улучшает функциональные возможности организма.

Литература:

- [1] *Агасаров Л. Г. и др.* Научно-практическое руководство для врачей «Санаторно-курортное лечение». Том 1. Основы санаторно-курортного лечения. М.: ООО «Реновация». 2022. – 496 с.
- [2] *Разумов А. Н.* Санаторно-курортное лечение: национальное руководство М.: ГЭОТАР-Медиа. 2021. – 752с.
- [3] *Сенько В. И. и др.* Медико-климатическая характеристика, минеральные воды и целебные пелоиды Беларуси. Мн.: Изд. Центр БГУ. 2023. – 168 с.
- [4] *Титкова Н. Д., Ясовеев М. Г.* // Оценка медико-климатических ресурсов Республики Беларусь // сб. материалов Международной научно-практической конф. Минск. 2015. С. 258–261.
- [5] *Баевский, Р. М. и др.* Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем. Вестник Аритмологии. 2001. №24. С. 65–87.
- [6] *Вейн, А. М.* Вегетативные расстройства. Клиника, диагностика, лечение. М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 752 с.
- [7] *Михайлов, В. М.* Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения метода. Иваново: Иван. гос. мед. академия. 2002. – 290 с.
- [8] *Bigger, J.T., Fleiss J.I., Steinman R.C.* RR variability in healthy middle-aged persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. Circulation. 1995. P. 1936–1943.

*N. D. TSITKOVA¹, S. V. GOUBKIN¹, S. B. KOHAN¹, O. Y. POLULIAKH¹, S. V. MIKHALCHIK²,
V. V. KOROTKIY²*

INFLUENCE OF HEALTH IMPROVEMENT FACTORS OF THE SANATORIUM RESORT AREA ON VACATIONERS IN SUE SANATORIUM «KRINITSA»

¹ *State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus*

² *Subsidiary unitary enterprises “Sanatorium Krinitsa”, Zhdanovichi, Republic of Belarus*

Summary

Sanatorium-resort health improvement and treatment of the population is an actual direction of study of physiological features of a person being in the conditions of sanatorium-resort area. Means of non-medicamentous treatment are factors of recovery, which have an advantage over drug therapy, improving the effectiveness of therapeutic and recovery activities in the conditions of the sanatorium. The concept of the state policy for the development of health resorts provides for the creation of comprehensive health improvement and medical rehabilitation programs using the natural and therapeutic potential of the territories of health resort organizations. The article presents the results of a study of the influence of health improvement factors in the sanatorium-resort area of the SUE «Sanatorium Krinitsa» on the electrophysiological parameters of the heart, the acid-base state and blood gases, as well as biochemical parameters in vacationers.

Key words: sanatorium-resort organization (SRO), sanatorium-resort locality (SRL), SUE «Sanatorium Krinitsa», natural resource potential, stress index (SI), indicator of activity of regulatory systems (PARS).

УДК 615.83(476)

Н. Д. ТИТКОВА¹, С. В. ГУБКИН¹, С. А. ГЕЛАХОВ², Э. С. КАШИЦКИЙ¹

МЕТЕОЗАВИМОСТЬ В САНАТОРНО-КУРОРТНЫХ УСЛОВИЯХ

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Дочернее унитарное предприятие «Санаторий «НАРОЧАНКА»», Нарочь, Республика Беларусь

Статья посвящена оценке метеозависимости отдыхающих в условиях санаторно-курортной местности. Природные процессы способствуют нашему организму противостоять многочисленным факторам, оказывающим отрицательное влияние на него. Негативные и болезненные реакции со стороны организма, возникающие при изменении погодных условий, выражаются в метеопатических реакциях, что в свою очередь проявляется в плохом самочувствии, головной боли, бессоннице, повышении и понижении артериального давления, спазмах коронарных и мозговых сосудов, в психоэмоциональном состоянии, ухудшении обменных, иммунных и других процессов. В условиях отдыха, оздоровления, реабилитации организм человека взаимодействует с окружающей средой (физические, географические, биологические, социальные условия) санаторно-курортной организации, поэтому изучение местности здравниц и возникающих метеопатических реакций оздоравливающихся, является чрезвычайно важным и перспективным направлением для сохранения здоровья и улучшения качества жизни населения.

Ключевые слова: метеозависимость, метеочувствительность, санаторно-курортная организации (СКО), санаторно-курортная местность (СКМ), санаторий «Нарочанка», природный ресурсный потенциал.

Введение. Медико-климатические факторы разнообразны и изменчивы, определяются основными характеристиками местности (широта, долгота, высота над уровнем моря, влияние холодных и теплых воздушных потоков, рельеф, ландшафт и др.). Резкое изменение их (атмосферное давление, температура воздуха и др.) сопровождается ухудшением психоэмоционального самочувствия, цефалгией, перепадами артериального давления, одышкой, вегетативной дисфункцией, головокружением, мышечными и суставными болями и др. [1, 4, 5]

Метеочувствительность, как заболевание в медицине не рассматривается, но людей реагирующих на колебания погодных условий, называют метеопатами. Диагностируется с учетом жалоб, объективной симптоматики, но лечение проводится в рамках основной патологии. Метеопатические реакции встречаются более чем у 40 % населения земного шара, особенно подвержены люди с заболеваниями сердечно-сосудистой системы около 70 %. Метеозависимым людям нужна самодиагностика своего организма. Необходимо самостоятельно определять наихудший тип сочетания изменений медико-климатических параметров окружающей среды на основе региональных прогнозов погоды для своего организма [4, 6, 7].

Цель исследования: оценить изменение общего состояния организма оздоравливающихся в санаторно-курортной местности санатория «Нарочанка».

Материалы и методы исследования. Исследования лиц, проходящих санаторно-курортное лечение и оздоровление в здравнице «Нарочанка» и выявление зависимости их состояния от погодных условий, проводилось с помощью анкетирования. Инструментом исследования выступала анкета. В опросе приняли участие 150 человек, из них 76 женщин и 74 мужчины, в возрасте от 35 до 80 лет, оздоравливающиеся в зимний (январь–февраль) и летний (июнь–июль) периоды в санатории.

Результаты и их обсуждение. Санаторий «Нарочанка» расположен на берегу живописного озера Нарочь, на территории Национального парка Нарочанский. Площадь санаторно-курортной местности (СКМ) занимает 17,0 га. Природный ресурсный потенциал СКМ разнообразен и благоприятен для оздоровления и лечения болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани, органов дыхания, системы кровообращения. Медико-климатические условия здравницы способствуют проведению аэротерапии, аэрофитотерапии, гелиотерапии, дасотерапии. Средние температуры воздуха: январь – -7 °С; июль – +20 °С. В течение года преобладают юго-западные, западные и южные ветры. Они характерны для зимнего, осеннего и весеннего сезонов. В апреле на

розе ветров появляется еще и северо-восточное направление ветра. В летний сезон чаще фиксируются ветры западного направления. Территория санатория находится на местности с самым высоким показателем безветренных дней во все сезоны года – от 19 % летом до 8 % зимой (рисунок 1).

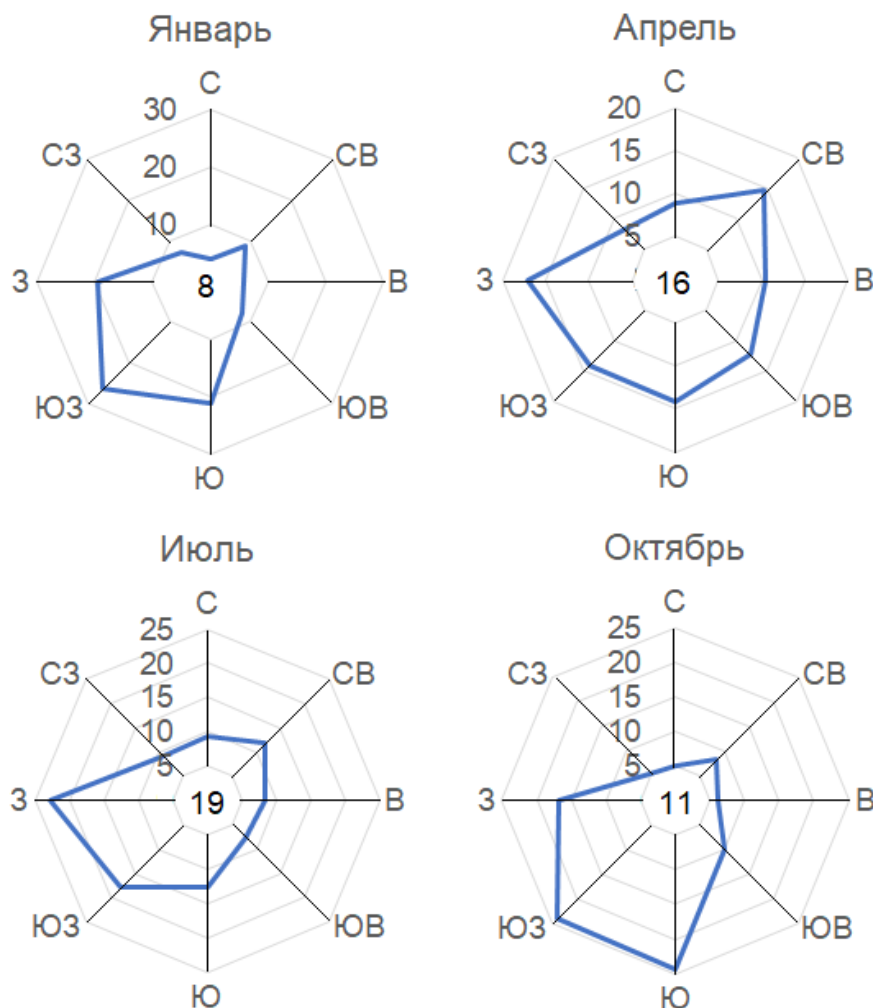


Рис. 1. Розы ветров центральных месяцев сезонов года санатория «Нарочанка»

Температура воды озера Нарочь от берега (23 м) летом превышает 18°C, а в июле составляет 23–24°C. Ландшафтные ресурсы санатория представлены волнистыми с озерами камами, сосновыми, еловыми, широколиственно-еловыми, черноольховыми лесами. Лесистость территории колеблется от 30 % до 40 % [2, 3].

Результаты исследования общего состояния лиц, находящихся в санатории «Нарочанка» и получавших весь комплекс услуг по санаторно-курортному лечению и оздоровлению рассматривались в возрастных группах 35–45 лет, 46–55 лет, 56–66 лет, старше 66. Среди оздоравливающихся преобладали женщины 51 % (рисунок 2).

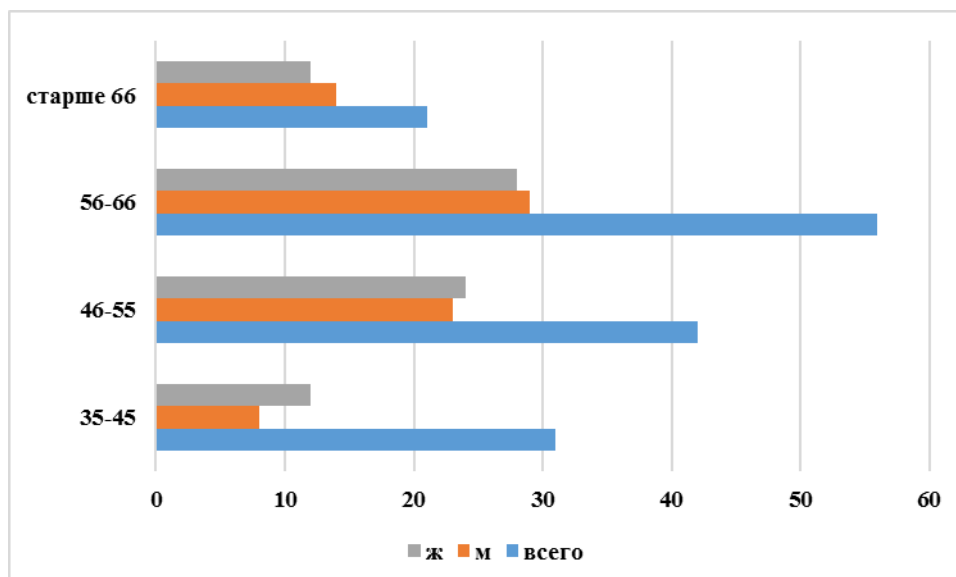


Рис. 2. Анализ гендерного и возрастного состава лиц, находящихся в условиях СКМ санатория «Нарочанка», человек

По результатам опроса 79 % знакомы с понятием «метеозависимость», а чуть меньше половины опрошенных (44 %) страдают от повышенной чувствительности организма к резким изменениям погоды, т.е. от метеопатии. Ответы, на данный вопрос преобладали в группе от 56–66 и старше 66 лет, более 77 %, но также ответы встречались во всех возрастных группах, но единично. Большинство оздоравливающихся (83 %), не знают, как бороться с данным недугом, а врачебные рекомендации соблюдают только 9 %. Кроме того, 64 % лиц, отдыхающих в санатории, отметили улучшение своего общего состояния организма и не наблюдали болезненных изменений, вызванных сменой погоды в санаторно-курортных условиях (рисунок 3).

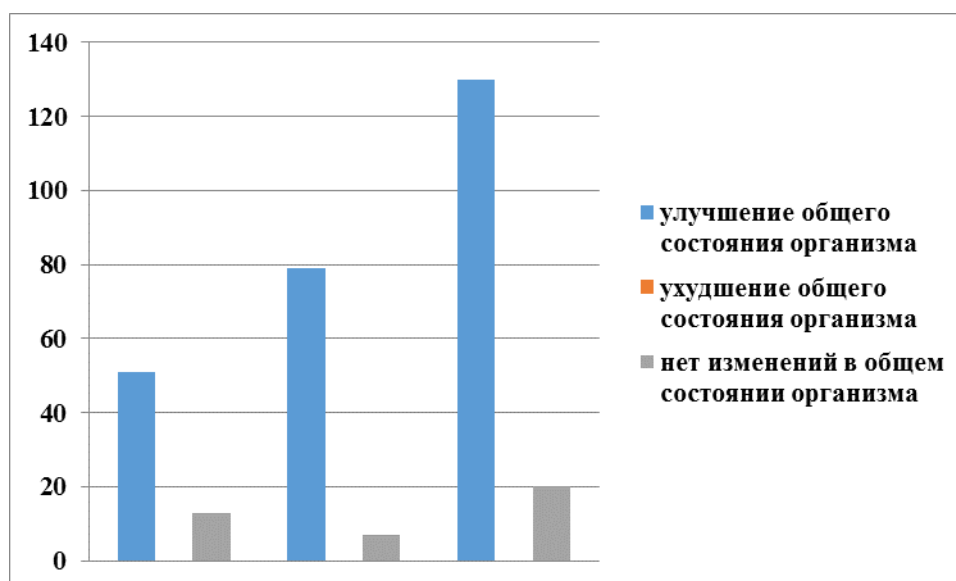


Рис. 3. Результаты ответов лиц, находящихся в условиях СКМ санатория «Нарочанка», человек

Оздоравливающиеся, как в зимний, так и в летний периоды не ощущали болезненных изменений организма, возникающих у них дома при изменении погодных условий (рисунок 4).



Рис. 4. Результаты ответов лиц, находящихся в условиях СКМ санатория «Нарочанка» в зимний и летний периоды, человек

Сложившиеся природные лечебные условия и ресурсы СКМ санатория «Нарочанка» способствовали 79 % отдыхающим улучшить общее состояние организма и не испытывать метеопатические реакции на протяжении всего времени пребывания в здравнице. Профилактические мероприятия, проводимые в санаторно-курортной организации «Нарочанка» направлены на уменьшение метеопатических реакций организма оздоравливающихся и заключаются в следующем: полноценное сбалансированное питание; 8-часовой ночной сон; лечебная физкультура, с комплексом разработанных упражнений для всех возрастных групп; прогулки, сон, тренировки, дыхательная гимнастика на природе, с учетом медико-климатических характеристик (температура, влажность, атмосферное давление, скорость ветра, солнечная инсоляция); фитотерапия; музыкотерапия; кислородные коктейли; массаж шеи и плечевого пояса; тепловые водные процедуры и др.

Заключение. Меры профилактики при метеозависимости имеют огромное значение и строго индивидуальны. В свою очередь, определяются как общим состоянием организма, так и характером проявления (чувствительность, реакция, обострение и т.д.). Сложившиеся комфортные условия санаторно-курортной местности санатория «Нарочанка» и комплекс оздоровительных мероприятий оказывают благоприятное воздействие на самочувствие лиц, проходящих лечение и оздоровление в здравнице.

Литература:

- [1] Разумов А. Н. Санаторно-курортное лечение: национальное руководство М.: ГЭОТАР-Медиа. 2021. – 752с.
- [2] Сенько В. И., Пономарев В. А., Губкин С. В., Кашицкий Э. С., Титкова Н. Д. Медико-климатическая характеристика, минеральные воды и целебные пелоиды Беларуси. Минск : Изд. Центр БГУ, 2023. – 168 с.
- [3] Титкова Н. Д., Ясоев М. Г. // Оценка медико-климатических ресурсов Республики Беларусь // материалы Международной науч-практич. конф. Минск. 2015. С. 258–261.
- [4] Бубличенко, М. М. Метеозависимость, или у природы нет плохой погоды? Р-Д : Феникс, 2006. – 186 с.
- [5] Клепиков О.В. и др. Изучение взаимосвязи между обострением сердечно-сосудистой патологии и метеофакторами // Пульс. 2021. Т23. №8. С. 110–116.
- [6] Солимене У., Бруньоли А., Минелли Э. Метеопатия: Влияние атмосферных условий на здоровье и настроение. Москва : Арнебия, 2003. – 223 с.
- [7] Капшук Е.А. и др. «Метеочувствительность» как фактор риска острых кардиоваскулярных заболеваний // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2018. Т.8. № 1 С. 17– 18.

N. D. TSITKOVA¹, S. V. GOUBKIN¹, S. A. GELAKHOV², E. S. KASHITSKIY¹

WEATHER RESISTANCE IN SANATORIUM-RESORT CONDITIONS

¹ *State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus",
Minsk, Republic of Belarus*

² *Subsidiary unitary Enterprise "Sanatorium "NAROCHANKA", Naroch, Republic of Belarus*

Summary

The article is devoted to the assessment of the weather dependence of vacationers in the conditions of a sanatorium-resort area. Natural processes help our body to resist numerous factors that have a negative impact on it. Negative and painful reactions from the body that occur when weather conditions change are expressed in meteopathic reactions, which in turn manifest themselves in poor health, headache, insomnia, increased and decreased blood pressure, spasms of coronary and cerebral vessels, in a psychoemotional state, deterioration of metabolic, immune and other processes. In conditions of recreation, health improvement, rehabilitation, the human body interacts with the environment (physical, geographical, biological, social conditions). Therefore, the study of the terrain of health resorts and the emerging meteopathic reactions of those recovering is an extremely important and promising area for preserving the health of the population and improving the quality of life.

Keywords: weather tolerance, weather sensitivity, sanatorium-resort organization (SKO), sanatorium-resort area (SCM), Sanatorium "Narochanka", natural resource potential.

УДК 616.69-008.8-076.1

А. О. КОЛОМИЕЦ¹, Л. В. БАТУРЕВИЧ²

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОКРАШИВАНИЯ ЭЯКУЛЯТА

¹ Научно- исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

² Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

В статье приведены литературные данные по оценке морфологических характеристик сперматозоидов. Изучены и описаны имеющие историческое значение и современные методы окрашивания препаратов эякулята. Отражены достоинства и недостатки разных методов окрашивания эякулята при оценке морфологии мужских половых клеток. Приведены результаты аналитического обзора литературных данных.

Ключевые слова: мужское бесплодие, морфологическая оценка сперматозоидов, эякулят, окрашивание эякулята.

Введение. В настоящее время частота встречаемости бесплодных браков составляет 10–15 %, причем около 25 % не достигают беременности в течение 1 года лечения по поводу бесплодия, и около 5 % семейных пар так и остаются бесплодными. Данная социальная проблема затрагивает практически в равной степени как женское, так и мужское население. Примерно 40 % случаев приходится на мужское бесплодие, 40 % – на женское, ещё 20 % – на смешанное [1].

С каждым годом отмечается рост заболеваний органов репродуктивной системы у мужчин. Это связано с изменением образа жизни современного мужчины, влиянием вредных привычек и факторов окружающей среды, бесконтрольным применением лекарственных средств. Влияние этих и других факторов на организм мужчины нередко приводит к развитию такой серьезной проблемы, как бесплодие. Комплексное и поэтапное клинико-лабораторное исследование пациентов с мужской инфертильностью позволяет дифференцированно и своевременно назначать лечение и оценить его эффективность в динамике.

Для установки причин нарушения фертильности проводится ряд лабораторных исследований, центральное место среди которых занимает спермограмма. Классическая спермограмма включает ряд показателей, позволяющих предположить причину нарушения фертильности и составить план дальнейшего обследования и лечения. При анализе результатов исследования ориентируются на нормы, рекомендованные Всемирной Организацией Здравоохранения [2].

Такие показатели спермограммы как количество сперматозоидов, их подвижность являются основными и используются при первичном скрининговом обследовании пациентов с бесплодием [5]. Морфологическая характеристика сперматозоидов является одним из основных показателей классической спермограммы, позволяющая определить наличие дефектов строения, влияющих на функцию половых клеток. Морфологические особенности спермиев влияют на возможность зачатия и являются хорошим индикатором мужской фертильности. При поиске причин бесплодия важно выявление наличия тех или иных отклонений в строении сперматозоидов, их сочетание друг с другом и с прочими характеристиками эякулята. Любое изменение в морфологии преобладающего числа спермиев приводит к снижению шансов на оплодотворение и риску выкидышей при успешном зачатии. При наличии нарушений в строении головки подвижные сперматозоиды не способны проникнуть в женскую половую клетку и оплодотворить ее, при патологии хвоста сперматозоиды становятся неподвижными или движутся хаотично, что также влияет на оплодотворяющую способность эякулята [3].

Снижение количества сперматозоидов с нормальными морфологическими характеристиками часто требует использование вспомогательных репродуктивных технологий, таких как интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Но и успех в проведении данных технологий также в значительной степени зависит от морфологических характеристик спермиев [4].

Материалы и методы исследования. Проведен анализ литературных данных за последние 70 лет по методам окраски эякулята, используемых при оценке морфологии сперматозоидов. В зависимости от различных способов окраски, рекомендованных в разные года Всемирной Организацией Здравоохранения, существуют разные подходы к классификации дефектов мужских половых клеток, которые также рассматриваются в представленной статье. Поиск литературных данных осуществлялся с помощью медицинской базы данных MEDLINE, документального фонда библиотеки учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», также с использованием электронных ресурсов.

Результаты и их обсуждение. Наиболее часто при обследовании мужчин при подозрении на бесплодие выявляется состояние субфертильности. Важнейшей характеристикой эякулята, нуждающейся при оценке состояния субфертильности, является морфология сперматозоидов [6].

В начале 1930-х были сделаны первые попытки оценить морфологические особенности сперматозоидов при бесплодии. Препарат эякулята, приготовленный обычным способом, фиксировался путем проведения предметного стекла с биоматериалом над пламенем горелки. Затем препарат несколько секунд обрабатывался 1 % раствором хлорамина для удаления слизи, водой и 95° этиловым спиртом. Окрашивание проводилось смесью фуксина и эозина или карболовым фуксином Циля в течение 2–5 минут. Растворы красителей готовили *ex tempore* [7].

Существует 2 метода приготовления карболового фуксина Циля:

1-й метод: использовался фуксин основной 1 г, спирт этиловый 96 % 10 мл, кристаллическая карболовая кислота 5 г, дистиллированная вода 100 мл;

2-й метод: использовался 10 % насыщенный спиртовой раствор основного фуксина 10 мл и 100 мл 5 % раствора карболовой кислоты.

После окрашивания препараты эякулята промывали водой и при необходимости докрашивали раствором Леффлера. Присутствие более 20 % (а по некоторым данным более 40 %) морфологически атипичных форм сперматозоидов считали основной причиной инфертильности у мужчин [8].

В 50-е годы при оценке морфологии сперматозоидов придерживались, подхода, предложенного MacLeod J., Gold R.Z. (либеральный подход) [9]. При этом приготовленные и высушенные при комнатной температуре препараты эякулята фиксировали 10 % раствором формалина и окрашивали либо раствором гематоксилина, либо методом Кауфмана. Рядом авторов было рекомендовано для оценки морфологии сперматозоидов использовать витальную окраску генциановым фиолетовым.

При окрашивании в течение 2–3 минут фиксированного мазка эякулята методом Кауфмана использовали Леффлеровскую метиленовую синьку. В состав Леффлеровской метиленовой синьки входит:

- 3 г метиленового синего, 20 мл 96 % раствора этилового спирта;
- 1 мл 1 % раствора гидроксида калия;
- 100 мл дистиллированной воды.

После окрашивания препарат смывался водой и погружался в 0,5 % раствор азотнокислого серебра или в 0,25 % водный раствор протаргола на 3–4 минуты. Затем окрашивали препарат в течение 5–10 секунд раствором карболового фуксина, разведенного в 20 раз. Многоэтапность окрашивания является недостатком метода Кауфмана. Достоинствами метода Кауфмана является: быстрота (вся процедура занимает менее трех минут), чистый фон мазка (слизистые элементы семенной жидкости не окрашиваются), четкая очерченность головки, шейки и хвоста сперматозоидов.

Согласно либеральному подходу, сперматозоиды разделялись по форме головки на группы:

- с нормальной овальной формой;
- с сужающейся или грушевидной головкой;
- с круглыми, гигантскими или булавочной формой головками;
- с дублирующими головками;
- с головками аморфного типа.

В своих исследованиях MacLeod J., Gold R.Z. использовали данный метод окрашивания препаратов эякулята и показали взаимосвязь между аномальной морфологией сперматозоидов и мужским бесплодием. К группе мужчин с сохраненной фертильностью были отнесены пациенты, в эякуляте которых присутствовало не более 20 % сперматозоидов с морфологическими дефектами. Но критерии, позволяющие отнести мужскую половую клетку к группе сперматозоидов с нормальной или патологической морфологией, не были четко определены. Все сперматозоиды без четко

визуализируемых в препаратах дефектов относили к группе клеток с нормальной морфологией, что, конечно, зависело от качества окрашивания препаратов.

В 1971 году R. Eliasson предложил разделять сперматозоиды с патологической морфологией на три группы: с аномалией головки, средней части и хвоста [5]. В это же время было предложено окрашивать препараты эякулята по Паппенгейму или гематоксилин-эозином.

При окраске препаратов по Паппенгейму используют краситель-фиксатор Май-Грюнвальда и краситель Романовского-Гимзе. Приготовленные и высушенные препараты эякулята помещают в неразведенный краситель-фиксатор Май-Грюнвальда, являющийся смесью эозина, метиленовой сини и метилового спирта. Спустя 3–5 минут фиксации раствор Май-Грюнвальда смывают небольшим количеством воды и заливают рабочим раствором красителя Романовского-Гимзе на 15–30 минут. После окраски препараты смывают водой и высушивают при комнатной температуре.

Окраска по Паппенгейму позволяет оценить размер и форму половых клеток, но не обеспечивает подробную и детальную визуализацию акросомальной и постакросомальной областей, осевого прикрепления средней части сперматозоида к головке. При этом сперматозоиды характеризуются большим разнообразием качества окрашивания. В этот период предложенный R. Eliasson принцип – «если вы не уверены, что сперматозоид ненормальный, он должен рассматриваться как нормальный» изменился. Все сперматозоиды с «пограничными» морфологическими характеристиками стали относить к группе половых клеток с патологической морфологией.

В 1980 и 1987 годах были опубликованы первое и второе издания рекомендаций Всемирной Организацией Здравоохранения по исследованию семенной жидкости [8]. Морфологические характеристики сперматозоидов были рекомендованы оценивать, основываясь на исследованиях R. Menkveld и R. Eliasson. При этом было рекомендовано окрашивать препараты по Папаниколау.

Метод окрашивания по Папаниколау многоэтапный, сперматозоиды окрашиваются в разные цвета: средние части сперматозоидов окрашиваются в красный цвет, а цитоплазматические капли в области акросомы – в зеленый. Сперматозоиды с простыми свернутыми хвостиками не относились к группе патологических клеток, так как считалась что такая аномалия может быть связана с осмотическим стрессом, который испытывает половая клетка при окрашивании [10].

В первом издании руководства Всемирной Организации Здравоохранения по лабораторному исследованию эякулята человека были приведены референсные значения по ряду показателей спермограммы. В каждом последующем издании руководства эти референсные значения лабораторных показателей спермограммы менялись в сторону снижения нижней границы.

Так в первом издании рекомендаций Всемирной Организации Здравоохранения по исследованию эякулята нижняя граница количества сперматозоидов с нормальной морфологией была 80,5%, во втором издании – 50 %, в третьем – 30 %, в четвёртом – 14 %, а в пятом издании нижняя граница референсных значений морфологически нормальных форм сперматозоида составила 4 %. При этом морфологические изменения в строении сперматозоидов подразделялись также на патологию головки, средней части и хвоста [11].

В более поздних изданиях руководства Всемирной Организации Здравоохранения по исследованию эякулята для оценка морфологических характеристик сперматозоидов были предложены «строгие критерии» Kruger-Menkveld [10]:

- головка ровная с четкой акросомой, составляющей 40–70 % головки;
- длина головки 3–5 мкм, ширина 2–3 мкм;
- отсутствие дефектов шеи или хвоста;
- средняя часть прикреплена в осевом направлении относительно головки;
- ширина средней части менее 1 мкм, длина примерно в полтора раза больше длины головы;
- могут присутствовать цитоплазматические капли (остатки), которые составляют менее половины размера головки спермы;
- хвост равномерный, немного тоньше, чем средняя часть, не свернутый, длиной 45 мкм;
- отношение длины головки к длине хвоста – 1:9 или 1:10. Пограничные формы головы без грубых отклонений рассматриваются как патологические [12].

При этом оценка морфологии сперматозоидов рекомендовано проводить в препаратах, окрашенных по Папаниколау, Шорру или красителем Diff-Quik. Метод по Шорру обеспечивает схожие результаты окрашивания препаратов эякулята с методом по Папаниколау (Meschede et al., 1993). Фиксация суховоздушных мазков спермы осуществляется погружением предметного стекла в

уксусный этанол или 75 % (v/v) этанол на 1 ч. Окраска фиксированных мазков спермы заключается в последовательном погружении предметного стекла в следующие растворы:

- гематоксилин (1–2 мин.);
- аммиачный спирт (10 погружений);
- этанол 50 % (5 мин.);
- краситель Шорра (3–5 мин.);
- этанол 50 % (5 мин.);
- этанол 75 % (5 мин.);
- этанол 95 % (5 мин.).

Одно погружение предметного стекла в емкость с раствором должно длиться около 1 секунды. После каждого реактива препарат эякулята ополаскивается проточной водой (12–15 погружений).

Перед использованием красителя Шорра 4 г порошка Шорра растворяют в 220 мл подогретого 50 % этанола. Далее охлаждают и добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и фильтруют. При этом головка сперматозоида в акросомальной области окрашивается в бледно-синий, а в постакросомальной в темно-синий цвет. Средняя часть сперматозоида окрашивается в красный цвет, хвост в синий или имеет красноватый оттенок [13]. Метод окрашивания по Шорру длительный и кропотливый.

Метод быстрого окрашивания с использованием набора Diff-Quik рекомендуется как один из скрининговых методов, который особенно полезен в клинических лабораториях, когда необходимо получить результат в день сдачи анализа. Набор для быстрого окрашивания Diff-Quik, состоит из:

- фиксатора – триарилметан, растворенный в метиловом спирте;
- красителя – эозинофильный ксантен;
- красителя – базофильный тиазин.

Фиксация суховоздушных мазков спермы осуществляется погружением предметного стекла в фиксатор триарилметан на 15 сек или в 95 % метанол на 1 ч. После подсушивания препарат фиксированных мазков спермы окрашивается путем последовательного погружения в растворы эозинофильного ксанта и базофильного тиазина. Излишний раствор удаляется на каждом этапе окрашивания путем помещения предметных стекол вертикально на фильтровальную бумагу [14, 15]. Данный метод окрашивания не лишён недостатков, одним из которых является не четкое окрашивание акросомальной области головки.

В 2021 году было выпущено шестое издание руководства Всемирной Организации Здравоохранения по обработке и исследованию эякулята человека, в котором был предложен ряд концепций по выполнению и интерпретации результатов исследования эякулята. Однако, существенных изменений в исследовании морфологических характеристик сперматозоидов не было предложено. Рекомендации по окрашиванию препаратов эякулята для оценки морфологических характеристик мужских половых клеток не изменились. Основные рекомендуемые методы окрашивания: метод по Шорру и метод быстрого окрашивания с помощью набора Diff-Quik.

Однако, в шестом издании руководства Всемирной Организации Здравоохранения отмечено, что некоторые мазки, окрашенные быстрыми методами, имеют высокую фоновую окраску и могут быть более низкого качества, чем мазки, окрашенные красителем Папаниколау. Было отмечено, что в препаратах эякулята, окрашенных методами по Шорру и с помощью набора Diff-Quik в сравнении с препаратами, окрашенными методом по Папаниколау, размеры головок сперматозоидов различаются [16].

Также при окрашивании препаратов эякулята для оценки морфологических характеристик мужских половых клеток существуют ряд других цитохимических методов окрашивания, хорошо себя зарекомендовавших, но отсутствующих в рекомендациях в шестом издании руководства Всемирной Организации Здравоохранения. Такими методами являются окрашивание набором реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (производитель ООО «ГЕМСТАНДАРТ», Санкт-Петербург, Россия) и набором Spermac Stain (производитель FertiPro N.V., Бельгия).

Набор «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» включает ряд реагентов для спермиологического исследования, среди которых присутствует краситель азури-эозин по Романовскому и фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду, используемых для оценки морфологических характеристик сперматозоидов. По сути, фиксирование препаратов эякулята раствором-красителем по Май-Грюнвальду с последующей окраской азури-эозином по Романовскому это хорошо известный старый метод окрашивания по Паппенгейму, о котором мы упоминали выше. При использовании красителей набора реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-

СПЕРМОГРАММА», как и при окрашивании по Паппенгейму, ядра клеток окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет [17].

В некоторых лабораториях морфология сперматозоидов оценивалась в препаратах, окрашенных красителями набора Spermac Stain. Набор Spermac Stain позволяет хорошо оценить морфологию мужских половых клеток, поскольку части сперматозоида (голова, акросома, экваториальный сегмент, средняя часть и хвост) окрашивают в разные цвета, облегчая дифференцирование сперматозоидов с аномальным строением. Методика включает следующие этапы:

1) фиксирование готовых препаратов эякулята путем погружения в фиксатор на 5 мин. Более длительное фиксирование допустимо. После препарат просушивается при комнатной температуре в вертикальном положении, не допуская касания к мазку эякулята в течение 15 мин;

2) поэтапное окрашивание в красителях:

- использование красителя А – 2 минуты;

- использование красителя Б – 1 минута;

- использование красителя С – 1 минута.

При окрашивании препарат несколько раз погружается в емкости с красителями и при смене красителя промывается и просушивается. Однако, данный метод окрашивания с использованием набора Spermac Stain имеет свои недостатки. Данный метод окрашивания длительный, кропотливый. При присутствии большого количества слизи в образце эякулята приводит к тому, что происходит нечеткое окрашивание сперматозоидов, не всегда прокрашиваются ядра в красный цвет, что затрудняет дифференцирование сперматозоидов с нормальной и патологической морфологией [18].

Заключение. 1. Современные рекомендации по исследованию эякулята человека – это результат долгих и кропотливых исследований в области лабораторной диагностики мужского бесплодия и репродуктологии. Эти рекомендации являются не окончательными и будут подвергаться дальнейшим изменениям.

2. Продолжается поиск более информативных, доступных и практичных методов окрашивания препаратов эякулята для оценки морфологических характеристик сперматозоидов и повышения диагностической эффективности исследования эякулята при нарушении фертильности мужчин.

3. Современные методы окрашивания препаратов эякулята, как рекомендованные Всемирной Организацией Здравоохранения, так и не вошедшие в рекомендации, имеют ряд недостатков. При окрашивании в препаратах: отсутствует четкая границы ядро/акросома, не всегда хорошо просматриваются ядро и жгутик, некоторые методы окраски длительные и не могут быть использованы в рутинной лабораторной практике. А так как от качества окраски зависит качество морфологической оценки, то это подталкивает к продолжению и поиску новых красителей и более удачных методов окрашивания препаратов эякулята.

Литература:

- [1] Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. 145 с.
- [2] Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Марголина Л.Т. Руководство по лабораторным методам исследования. НАРКОМЗДРАВ СССР: МЕДГИЗ, Москва-Ленинград, 1938. 605 с.
- [3] Ernest W., Page M., Florence Houlding A.B. The clinical interpretation of 1000 semen analyses among applicants for sterility studies // Fertility and Sterility. 1951. Vol. 2. P. 140–151.
- [4] Marriage J., Ruth Z. The male factor in fertility and infertility. Sperm morphology in fertile and infertile // Fertility and Sterility. 1951. Vol. 5. P. 394–414.
- [5] Eliasson R., Treichl L. Supravital staining of human spermatozoa // Fertility and Sterility. 1971. Vol. 22. P.134–137.
- [6] Web of science. – <http://www.myshared.ru/slide/492107/>.
- [7] Mortimer D., Leslie E.E., Kelly R.W., Templeton A.A. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. // Journals of Reproduction and Fertility. 1982. Vol. 64. P. 391–399.
- [8] Гатимель Н., Моро Ж., Парино Ж., Леандри Р.Д. Морфология спермы: оценка, патофизиология, клиническая значимость и современное состояние в 2017 году // Андрология. 2017. №5. С. 845–862.
- [9] Kruger T., Thomas C., Daniel R., Franken Ph.D., Menkveld R., Carl J. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS t // Fertility and Sterility. 1995. Vol. 63. P. 134–141.

- [10]Ombelet W., Bosmans E., Janssen M. et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing // Human Reproduction. 1997. Vol.12. P. 987–993.
- [11]Gatimel N., Moreau J., Parinaud J., Léandri R.D. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017 // Andrology. 2017. P.845–862.
- [12]Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью: переведено с англ. // МедПресс. 2001. 144 с.
- [13]Олефир Ю.В., Монаков Д.М. Клиническое значение морфологии сперматозоидов в выборе метода лечения мужского бесплодия // Андрология. 2021. №14. С. 127–132.
- [14]Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью: переведено с англ. М.: Капитал принт // Всемирная Организация Здравоохранения. № 5. 2010. 54 с.
- [15]WHO Manual for the Examination and Processing of human semen // World Health Organization. 6th ed 2021. P. 4960.
- [16]Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И., Долгов В.В. Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины// Журнал: Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2020. №1–2. С. 41–49.
- [17]Web of science. – <https://celldiagnostic.by/>.
- [18]MacLeod J., Gold R.Z. The Male Factor in Fertility and Infertility // Sperm morphology. 1951. Vol. 2. P. 394–414.

A. O. KOLOMIETS¹, L. V. BATUREVICH²

COMPARATIVE ANALYSIS OF EJACULATE STAINING METHODS

*¹ Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus*

*² Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel, Belarusian State Medical
University, Minsk, Republic of Belarus*

Summary

Current literature information on the morphological assessment of spermatozoa is provided, which makes it possible to determine the presence of structural defects that affect the function of germ cells. Both leading and outdated variants of sperm staining have been studied and described. The advantages and disadvantages of the morphological assessment of male germ cells using different staining methods are reflected. The main results of an analytical review of literature data are presented.

Key words: male infertility, morphological assessment of sperm, ejaculate, ejaculate staining.

K. H. I. ILYAS

THE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF DYSLIPIDEMIA IN T2DM DIABETES PATIENTS

*Educational Institution "Grodno State University named after Yanka Kupala",
Grodno, Republic of Belarus*

This systematic review's objective is to assess the biochemical indicators of dyslipidemia in people with T2DM mellitus and its consequences. Using the databases from Google Scholar, Web of Science, and PubMed, we carried out a systematic review. We looked for papers that were published between 2018 and 2023. Search criteria included "dyslipidemia," "T2DM diabetes mellitus," "biochemical parameters," and "complications." Studies on the biochemical characteristics of dyslipidemia in T2DM patients and its consequences were included in our review. The search returned total 682 articles, there were 404 articles from Google Scholar, 258 articles from Web of Science, and 20 articles from PubMed. Results revealed an association between T2DM and dyslipidemia, the study also revealed increased levels of low density lipoprotein, triglycerides and elevated levels of inflammation markers. The T2DM in comparison to healthy controls was related to high levels of low density lipoprotein over 200 mg/dL, triglycerides over 400 mg/dL, cholesterol over 300 mg/dL.

Key words: T2DM, cardiovascular diseases, biochemical parameters, dyslipidemia.

Introduction. Diabetes mellitus, specifically T2DM diabetes, has become a prevalent worldwide epidemic, impacting a significant number of individuals [1]. The condition under consideration is a metabolic anomaly that is typified by elevated levels of glucose in the blood, which is caused by impairments in the secretion of insulin, its action, or both [2]. T2DM diabetes is frequently linked with metabolic irregularities such as dyslipidemia, in addition to increased blood glucose levels [3–5]. Dyslipidemia, characterized by an atypical lipid profile, is a prevalent metabolic anomaly that is frequently encountered in patients diagnosed with T2DM diabetes [6, 7]. The condition is distinguished by elevated levels of “total cholesterol” (TC), “low-density lipoprotein cholesterol” (LDL-C), “triglycerides” (TG), and diminished levels of “high-density lipoprotein cholesterol” (HDL-C) [8, 9].

The coexistence of dyslipidemia and T2DM diabetes significantly increases the likelihood of cardiovascular complications, including atherosclerosis, coronary artery disease, and stroke [10, 11, 12]. Comprehending the complex interconnection between dyslipidemia and T2DM diabetes is imperative for the efficacious control and avoidance of related complications [13, 14]. This systematic review's objective is to assess the biochemical indicators of dyslipidemia in people with T2DM mellitus and its consequences. The ultimate objective is to enhance lipid management and alleviate the impact of diabetic complications among Patients afflicted with T2DM diabetes.

Materials and methods of research. Using the databases from Google Scholar, Web of Science, and PubMed, we carried out a systematic review. We looked for papers that were published between 2018 and 2023. Search criteria included "dyslipidemia," "T2DM mellitus," "biochemical parameters," and "complications." Studies on the biochemical characteristics of dyslipidemia in T2DM patients and its consequences were included in our review. The search returned 404 articles from Google Scholar, 258 articles from Web of Science, and 20 articles from PubMed.

The inclusion criteria include observational studies that look at the relationship between T2DM diabetes and dyslipidemia. Studies that provide data on one or more biochemical factors associated with dyslipidemia, such as total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides. Studies that detail cardiovascular disease, nephropathy, and retinopathy as well as other consequences related to dyslipidemia in people with T2DM diabetes.

Exclusion Criteria are studies that don't include any information on dyslipidemia-related biochemical markers and studies that primarily examine type 1 diabetes or other forms of diabetes.

Results and its discussion. A total of 14 studies were chosen from the papers we filtered. The following information was taken from each study: author name, year of publication, study design, sample size, participant age range, gender distribution, biochemical parameters assessed (e.g., total cholesterol, LDL

cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides), and complications related to dyslipidemia in people with T2DM diabetes.

Khavandi et al. conducted a study to explicate the physiological and metabolic modifications in lipids that manifest in patients diagnosed with T2DM diabetes. The present investigation concerns the differentiation between lipid and lipoprotein metabolism that characterizes the dyslipidemia evident in persons afflicted with “insulin resistance” and T2DM diabetes. The relevance of the recently released AHA/ADA treatment guidelines for individuals with dyslipidemia is currently under examination. It provide a current overview of the pathophysiology of diabetic dyslipidemia, with a particular focus on the involvement of various apolipoproteins, including apoC-III. Additionally, we highlight recent research and novel therapeutic agents for managing lipid disorders in patients diagnosed with T2DM mellitus [15].

Müller-Wieland et al. conducted a clinical trial to evaluate the effectiveness and safety of alirocumab, a PCSK9 inhibitor, compared to standard lipid-lowering care in individuals with T2DM and mixed dyslipidemia who are at a high risk of cardiovascular disease and have inadequately controlled non-HDL-C levels despite receiving the maximum tolerated dose of statin therapy. The study's design and rationale are centered on this objective. The study aims to evaluate the effectiveness and safety of alirocumab compared to standard lipid-lowering care in individuals with T2DM and mixed dyslipidemia who are at a heightened risk for cardiovascular disease. The primary measure of effectiveness will be (non-HDL-C) [16].

Klasic et al. aims to investigate the potential benefits of identifying markers associated with oxidative stress, inflammation, and dyslipidemia in predicting non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in individuals with T2DM mellitus (DM2), as assessed by the fatty liver index (FLI). The implementation of a multimarker approach that encompasses biomarkers associated with oxidative stress, dyslipidemia, and inflammation may prove advantageous in the identification of individuals with diabetes who are at an elevated risk of developing fatty liver disease [17].

Shahwan et al. aims to investigate the frequency of dyslipidemia among individuals diagnosed with T2DM mellitus (DM) and to establish a correlation between dyslipidemia and other healthcare and biochemical parameters. A cross-sectional study Dyslipidemia exhibits a high prevalence among individuals with diabetes, particularly in those who have inadequate glycemic control. This necessitates the implementation of early and comprehensive lipid profile screening. There exists a pressing need for interventions aimed at achieving strict glycemic control, optimal lipid profile management, and lifestyle modifications among all individuals diagnosed with diabetes in order to attain a target HbA1C value of ≤ 7 [18].

Malindisa et al. induced cross-sectional study to assess the prevalence of non-communicable diseases (NCDs) among young adults residing in an urban low- and middle-income country (LMIC) context, with a specific focus on Tanzania. An alarming incidence of diabetes, impaired glucose tolerance, hypertension, overweight, obesity, and dyslipidemia was noted among the young adult population in Mwanza. The present study underscores the imperative of implementing coordinated endeavors aimed at addressing non-communicable diseases (NCDs) among the young adult population in Tanzania [19].

Al-Kaaby et al. promoted a cross-sectional study to investigate certain biochemical parameters that are linked to T2DM mellitus within the geographical region of Misan province. The findings suggest a noteworthy rise ($p < 0.05$) in blood glucose levels and HbA1C levels across all diabetes groups in comparable to control group. The levels of cholesterol, triglyceride, LDL, and VLDL exhibited a significant increase ($p < 0.05$) in all diabetes groups as compared to the control group. The study findings indicate a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in HDL levels across all diabetes groups in comparison to the control group, when age and duration were taken into account. Elevated levels of cholesterol, triglyceride, LDL, and VLDL, coupled with reduced levels of HDL, are recognized as risk factors for the development of coronary heart disease [20].

Thakur et al. conducted a cross-sectional study and a case control to investigate the anthropometric and biochemical parameters of individuals diagnosed with (T2DM) residing in rural regions of Sirmaur district who seek medical attention at Dr. Yashwant Singh Parmar Government Medical College and Hospital in Nahan, Himachal Pradesh, India. In addition to examining the potential correlation between the variables of interest and to assess the potential risk of coronary heart disease (CHD) in relation to patients and to identify the presence of Metabolic Syndrome among them. Anthropometric indices have been found to be reliable indicators of T2DM Mellitus (T2DM) and patients with this condition often exhibit asymptomatic dyslipidemia. T2DM has a notable impact on an individual's overall health, particularly in relation to the risk factors associated with “coronary heart disease” (CHD). The implementation of prompt lifestyle modifications and pharmacological interventions, coupled with consistent monitoring, has the potential to mitigate risk factors and minimize related complications [21].

Haile and Timerga assess the prevalence of dyslipidemia and its correlated risk factors in patients diagnosed with T2DM who receive medical care at Jimma Medical Center (JUMC) located in Jimma, Ethiopia. It was an institution-based- cross-sectional study. The study conducted in the area revealed a significant incidence of dyslipidemia among individuals with T2DM diabetes [22].

Mehalingam et al. at 2020 evaluated the degree of thyroid dysfunction among individuals diagnosed with T2DM mellitus and to ascertain the correlation between thyroid dysfunction and complications arising from diabetes. It was a cross-sectional study the co-occurrence of thyroid dysfunction and T2DM mellitus is observed in 17,5 % of patients. There was no observed correlation between thyroid dysfunction and diabetic complications [23].

Gazzaz et al. investigate the correlation between dyslipidemia and comorbidities with risk factors in patients diagnosed with type-2 diabetes mellitus (T2DM) who are receiving medical care at King Abdulaziz University Hospital (KAUH) in Jeddah, Saudi Arabia (SA). A cross sectional study comorbidities increased with age, with hypertension, coronary heart disease, and dyslipidemia being the most common. Our research has shed light on the evolving patterns of T2DM symptoms and complications. All of these highly morbid sequelae of this preventable disease can be avoided with efficient management and control by early screening and building healthy lifestyles in our patients [24].

Bawah et al. studied the prevalence of lipid irregularities among individuals diagnosed with T2DM. It was a cross-sectional study. The study revealed a significant prevalence of dyslipidemia among individuals exhibiting elevated levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). These findings corroborate previous claims that individuals with T2DM mellitus are susceptible to the emergence of lipid irregularities [25].

Majeed et al. assessed the efficacy of EOE in mitigating hyperglycemia and dyslipidemia relative to metformin, which is the recommended initial therapy for individuals newly diagnosed with T2DM according to the guidelines of the American Diabetes Association. A randomized open-label, three-arm, comparative, multicenter study. The study findings indicate that the EOE-2 g group exhibited significantly lower levels of FBS, PPBS, and HbA1c when compared to both the metformin and EOE-1 g groups. The study findings indicate that the EOE-2 g group exhibited significantly greater reductions in LDL and TC compared to the EOE-1 g group, and these reductions were found to be similar to those observed in the metformin group. No significant detrimental impacts were noted among any of the subjects involved in the studies. The administration of EOE-1 at a dosage of 1 g and 2 g per day has been deemed safe and efficacious in treating diabetes. Its effectiveness is comparable to that of metformin, a commonly prescribed pharmaceutical drug for diabetes management. The administration of EOE-2 at a dosage of g day⁻¹ exhibited superior effectiveness in decreasing circulating glucose levels compared to metformin [26].

In 2023, Behrouj et al. examined the correlation between the rs17669 polymorphism and the circulating level of miR-122, as well as the risk of developing T2DM mellitus (T2DM) and associated biochemical parameters in both T2DM patients and healthy controls who were matched for comparison. The variant rs17669 of miR-122 does not exhibit any association with the expression of miR-122 or serum parameters associated with T2DM Mellitus. Additionally, it is possible to suggest that the dysregulation of miR-122 is implicated in the development of T2DM by inducing dyslipidemia, hyperglycemia, and insulin resistance [27].

The etiology of dyslipidemia in T2DM Mellitus entails a multifaceted interaction of various metabolic irregularities [28]. Insulin resistance, which is a characteristic feature of T2DM, holds a pivotal position [29]. The development of insulin resistance is associated with heightened lipolysis in adipose tissue, which in turn leads to an upsurge in the concentration of free fatty acids (FFAs) in the circulatory system [30]. Subsequently, the liver uptakes the surplus free fatty acids (FFAs), which results in an escalation of hepatic synthesis of VLDL particles that are abundant in triglycerides (TG) [31].

Furthermore, the impairment of hepatic glucose production suppression due to insulin resistance results in hyperglycemia [32]. Elevated levels of blood glucose, or hyperglycemia, stimulate the hepatic production of triglycerides. The elevated levels of triglycerides in T2DM can be attributed to the combined impact of augmented hepatic triglyceride synthesis and hindered clearance of triglyceride-rich lipoproteins [33, 34]. Additionally, insulin resistance has been linked to reduced lipoprotein lipase activity, an enzyme accountable for the elimination of TG-rich lipoproteins [35–37] This results in the postponed clearance of remnants and elevated levels of LDL-C [38]. The metabolic process of HDL-C is also disrupted by insulin resistance, resulting in a decrease in the levels of HDL particles that provide protection [39, 40].

According to estimates, a significant proportion of individuals diagnosed with T2DM - ranging from 70–80 % – also experience dyslipidemia [41]. The elevated occurrence of dyslipidemia and T2DM can be

ascribed to the common risk factors that they share, such as genetic predisposition [42], sedentary lifestyle [43], obesity [44], and poor dietary habits [45]. Moreover, the coexistence of dyslipidemia in T2DM frequently intensifies the metabolic irregularities and elevates the likelihood of encountering cardiovascular complications [46, 47].

The presence of both T2DM and dyslipidemia is associated with a noteworthy elevation in the likelihood of experiencing cardiovascular complications. Increased concentrations of LDL-C and TG, in conjunction with decreased levels of HDL-C, are significant factors in the pathogenesis of atherosclerosis [48, 49], a primary etiology of cardiovascular ailments including coronary artery disease [50], myocardial infarction [51], and stroke [52].

LDL-C, commonly recognized as the unfavorable cholesterol, significantly contributes to the development of atherosclerotic plaques [53]. Conversely, decreased levels of “high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)”, also known as the favorable cholesterol [54] impede the process of reverse cholesterol transport [55]. This process is responsible for eliminating surplus cholesterol from peripheral tissues [56, 57]. Furthermore, dyslipidemia in T2DM is linked to a state of inflammation and blood clotting, which exacerbates the likelihood of cardiovascular incidents [58, 59].

In the context of T2DM, the management of dyslipidemia necessitates a comprehensive strategy. The adoption of lifestyle modifications [60], such as the consumption of a nutritious diet [61], consistent engagement in physical exercise [62], and maintenance of a healthy weight [63] are essential in enhancing lipid profiles. Furthermore, pharmacological measures, such as statins, fibrates, and cholesterol absorption inhibitors, may be administered to address particular lipid irregularities [64, 65, 66]. The optimization of diabetes management and regulation of glycemic levels are also factors that positively impact the amelioration of dyslipidemia [67].

Conclusion. Dyslipidemia is a commonly occurring metabolic aberration observed in individuals with T2DM, resulting from insulin resistance and other related factors. The presence of dyslipidemia in patients diagnosed with T2DM is correlated with a significant increase in the probability of encountering cardiovascular complications.

References:

- [1] *Ribeiro B.A., Vieira Lima C.P., Alves L.S., Damé-Teixeira N.* Impact of detection criteria on coronal and root caries estimates in adults with and without T2DM mellitus // *Clinical Oral Investigations*. 2022 Apr 1. P.1-9.
- [2] *Salau V.F., Erukainure O.L., Olofinson K.A., Msomi N.Z., Ijomone O.K., Islam M.S.* Ferulic acid mitigates diabetic cardiomyopathy via modulation of metabolic abnormalities in cardiac tissues of diabetic rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* // 2023. Vol. 37(1). P. 44–59.
- [3] *Dube M., Singh S.P., Khare N.* Prevalence and pattern of dyslipidemia and associated factors in naïve T2DM mellitus patients: a cross-sectional study from western Uttar Pradesh // *Prevalence*. 2022. Vol.15(8). P. 234.
- [4] *Jing H., Zhang Y., Zhang Y.* The Role of Capsaicin in Metabolism of Glucose, Lipids and in Hypertension // 2023. 28(13).
- [5] *Hamoodah Z.J., Hasan I.R., Mejbel S.A., Ali A.T.* Hyperlipidemia among Patients with T2DM Mellitus in Al-Nasiriya City // *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. 2022. P. 993–998.
- [6] *Treiber G., Guilleux A., Huynh K., Bonfanti O. etc.* Lipotrophic diabetes in familial partial lipodystrophy type 2: From insulin resistance to diabetes // *Diabetes & Metabolism*. 2023. Vol. 49(2). P.409.
- [7] *Raharinavalona S.A., Raheison R.E., Razanamparany T., Randrianomanana T.V., Rakotomalala A.D.* Epidemiological-clinical and paraclinical particularities of acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation in T2DM mellitus: Retrospective comparative study in a Malagasy population // *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*. 2022. Vol. 5(6). P.383.
- [8] *Amerizadeh A., Ghaheh H.S., Vaseghi G., Farajzadegan Z., Asgary S.* Effect of Oat (*Avena sativa* L.) Consumption on Lipid Profile with Focus on Triglycerides and High-density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C): An Updated Systematic Review // *Current Problems in Cardiology*. 2022. P.153.
- [9] *Weldegiorgis M., Woodward M.* Elevated triglycerides and reduced high-density lipoprotein cholesterol are independently associated with the onset of advanced chronic kidney disease: a cohort study of 911,360 individuals from the United Kingdom // *BMC nephrology*. 2022.23(1). P.1–9.
- [10] *Zhang X., Liu F., Li W., Zhang J. etc.* Metabolic Score for Insulin Resistance (METS-IR) Predicts Adverse Cardiovascular Events in Patients with T2DM and Ischemic Cardiomyopathy // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2023. P.1283–1295.
- [11] *Li H., Li M., Dong S., Dong A. etc.* Preliminary study of the interactive effects of coronary heart disease and lacunar infarction on renal function in patients with T2DM mellitus by gender // *Journal of Diabetes and its Complications*. 2023. P.477.

- [12]Si S.C., Yang W., Luo H.Y., Ma Y.X., Zhao H., Liu J. Association of bone turnover biomarkers with severe intracranial and extracranial artery stenosis in T2DM mellitus patients // *World Journal of Diabetes*. 2023. Vol.14(5). P. 594–605.
- [13]Wang S., Ren H., Zhong H., Zhao X. etc. Combined berberine and probiotic treatment as an effective regimen for improving postprandial hyperlipidemia in T2DM patients: a double blinded placebo controlled randomized study // *Gut Microbes*. 2022. Vol.14(1). P.176.
- [14]Chawla R., Madhu S.V., Makkar B.M., Ghosh S., Saboo B., Kalra S. RSSDI-ESI Consensus Group. RSSDI-ESI clinical practice recommendations for the management of T2DM mellitus 2020 // *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2020. Vol. 24(1):1.P.22–35.
- [15]Khavandi M., Duarte F., Ginsberg H.N. et al. Treatment of Dyslipidemias to Prevent Cardiovascular Disease in Patients with T2DM // *Curr Cardiol Rep* 19, 7. 2017.
- [16]Müller-Wieland D., Leiter L.A., Cariou B. et al. Design and rationale of the ODYSSEY DM-DYSLIPIDEMIA trial: lipid-lowering efficacy and safety of alirocumab in individuals with T2DM and mixed dyslipidemia at high cardiovascular risk // *Cardiovasc Diabetol* 16, 70. 2017.
- [17]Kliscic A., Isakovic A., Kocic G., Kavacic N. etc. Relationship between oxidative stress, inflammation and dyslipidemia with fatty liver index in patients with T2DM mellitus // *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2018. Vol. 126(06). P. 371–378.
- [18]Shahwan M.J., Jairoun A.A., Farajallah A., Shanabli S. Prevalence of dyslipidemia and factors affecting lipid profile in patients with T2DM // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2019. Vol. 13(4). P.2387–2392.
- [19]Malindisa E.K., Balandya E., Njelekela M.A., Mashiri F. Magnitude of T2DM Mellitus, Dyslipidemia and Hypertension Among Young Adults in Urban Settings: A Cross Sectional Survey in Mwanza, Tanzania. DOI: 10.11604/pamj.2022.42.19.22184.
- [20]Al-Kaaby H.H., AL-Ali Z.A. Evaluation of the lipid profile in T2DM mellitus patients in Misan province. DOI:10.35124/bca.2019.19.S1.2245.
- [21]Thakur K., Singh M.M., Jaswal R., Sharma K.K. Correlation between anthropometric indices and dyslipidemia in T2DM: CHD risk assessment and identification of Metabolic Syndrome.
- [22]Haile K., Timerga A. Dyslipidemia and Its Associated Risk Factors Among Adult Type-2 Diabetic Patients at Jimma University Medical Center, Jimma, Southwest Ethiopia // *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020. P. 4589–4597.
- [23]Mehalingam V., Sahoo J., Bobby Z., Vinod K.V. Thyroid dysfunction in patients with T2DM mellitus and its association with diabetic complications // *J Family Med Prim Care*. 2020. Vol. 9(8). P.4277–4281.
- [24]Gazzaz Z.J., Iftikhar R., Jameel T., Baig M., Murad M.A. Association of dyslipidemia and comorbidities with risk factors among diabetic patients: a retrospective analysis // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2020;13. P.935.
- [25]Bawah A.T., Darko R., Abaka-Yawson A. et al. Dyslipidemia and its associated factors in patients with T2DM mellitus. *J Public Health (Berl.)* 29. 2021. P.985–991.
- [26]Majeed M., Mundkur L., Paulose S., Nagabhushanam K. Novel *Embllica officinalis* extract containing β -glucogallin vs. metformin: a randomized, open-label, comparative efficacy study in newly diagnosed T2DM mellitus patients with dyslipidemia // *Food & Function*. 2022. Vol.13(18). P.9523–9531.
- [27]Behrouj H., Moridi H., Moradi M.N., Ghasemi H. miR-122 dysregulation is associated to the type2 diabetes mellitus-induced dyslipidemia and hyperglycemia independently to its variant rs17669.
- [28]Bhatti J.S., Sehrawat A., Mishra J. et al. Oxidative stress in the pathophysiology of T2DM and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.019.
- [29]Janssen J.A. Hyperinsulinemia and its pivotal role in aging, obesity, T2DM, cardiovascular disease and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22(15). P.7797.
- [30]Rafikovna N.U. To the question of the role of free fatty acids in the formation of insulin resistance and metabolic syndrome // *World Bulletin of Public Health*. 2022. Vol.8. P.179–182.
- [31]Kaur K.K., Allahbadia G.N., Singh M. An update on the Risk Factors Correlating NAFLD with Cardiovascular Disease: specifically mitochondrial-fatty acids β oxidation in Liver with therapeutic approaches of avoidance of CVD associated mortality - a Systematic Review // *Endocrinol*. 2022. P.25.
- [32]Campbell P.J., Mandarino L.J., Gerich J.E. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Metabolism*. 1988 Jan 1. Vol. 37(1). P.15–21.
- [33]Björnson E., Adiels M., Taskinen M.R., Borén J. Kinetics of plasma triglycerides in abdominal obesity // *Current opinion in lipidology*. 2017. Vol.28(1). P.11–18.
- [34]Bays H., Mandarino L., DeFronzo R.A. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of T2DM mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004. Vol.89(2). P.463–478.
- [35]Huhtala M., Rönnemaa T., Tertti K. Insulin Resistance Is Associated with an Unfavorable Serum Lipoprotein Lipid Profile in Women with Newly Diagnosed Gestational Diabetes // *Biomolecules*. 2023. Vol.13(3). P.470.

- [36]Fujino Y., Yasuda-Yamahara M., Tanaka-Sasaki Y. Limited effects of systemic or renal lipoprotein lipase deficiency on renal physiology and diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022. Vol.620. P. 15–20.
- [37]Wen Y., Chen Y.Q., Konrad R.J. The regulation of triacylglycerol metabolism and lipoprotein lipase activity. *Advanced Biology*. 2022 Oct. Vol. 6(10). P. 220–293.
- [38]Wang K., Ding Y., Wang R. etc. Remnant Cholesterol and the Risk of Coronary Artery Disease in Patients With T2DM. *Angiology*. 2022. Vol.14. P.210–228.
- [39]Li M., Chi X., Wang Y., Setrerrahmane S., Xie W., Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022. Vol.7(1). P.216.
- [40]Alnami A., Bima A., Alamoudi A., Eldakhakhny B., Sakr H., Elsamanoudy A. Modulation of Dyslipidemia Markers Apo B/Apo A and Triglycerides/HDL-Cholesterol Ratios by Low-Carbohydrate High-Fat Diet in a Rat Model of Metabolic Syndrome // *Nutrients*. 2022. Vol.14(9). P.1903.
- [41]Marchesini G., Bugianesi E., Burra P. etc. Non-alcoholic fatty liver disease in adults 2021: A clinical practice guideline of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF), the Italian Society of Diabetology (SID) and the Italian Society of Obesity (SIO) // *Digestive and Liver Disease*. 2022. Vol. 54(2). P.170–182.
- [42]Lima J.E., Moreira N.C., Sakamoto-Hojo E.T. Mechanisms underlying the pathophysiology of T2DM: From risk factors to oxidative stress, metabolic dysfunction, and hyperglycemia. *Mutation Research // Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2022. Vol. 874. P.503–517.
- [43]Ciumărnean L., Milaciu M.V., Negrean V. etc. Cardiovascular risk factors and physical activity for the prevention of cardiovascular diseases in the elderly // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022. Vol. 19(1). P.207.
- [44]García-García I., Michaud A., Jurado M.Á., Dagher A., Morys F. Mechanisms linking obesity and its metabolic comorbidities with cerebral grey and white matter changes // *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2022. Vol. 23(4). P.833843.
- [45]Bonekamp N.E., van Damme I., Geleijnse J.M. etc. Effect of dietary patterns on cardiovascular risk factors in people with T2DM. A systematic review and network meta-analysis // *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2022. P.110–120.
- [46]Hassen G., Singh A., Belete G. etc. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Emerging Modern-Day Risk Factor for Cardiovascular Disease // *Cureus*. 2022. Vol.14(5). P.354–360.
- [47]Berta E., Zsíros N., Bodor M., Balogh I. etc. Clinical Aspects of Genetic and Non-Genetic Cardiovascular Risk Factors in Familial Hypercholesterolemia // *Genes*. 2022. Vol.13(7). P.1158.
- [48]Lütjohann D., Klör H.U., Stellaard F. etc. Measurement of Serum Low Density Lipoprotein Cholesterol and Triglyceride-Rich Remnant Cholesterol as Independent Predictors of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Possibilities and Limitations // *Nutrients*. 2023. Vol.15(9). P.2202.
- [49]Zhang Y., Luo S., Gao Y., Tong W., Sun S. High-Density Lipoprotein Subfractions Remodeling: A Critical Process for the Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases // *Angiology*. 2023 Feb 14. P.74–79.
- [50]Magnani G., Bricoli S., Ardisino M., Maglietta G. Long-term outcomes of early-onset myocardial infarction with non-obstructive coronary artery disease (MINOCA). *International Journal of Cardiology*. 2022. Vol.354. P.7–13.
- [51]Biery D.W., Berman A.N., Singh A. Association of smoking cessation and survival among young adults with myocardial infarction in the partners YOUNG-MI registry // *JAMA Network Open*. 2020. Vol. 3. P.209–219.
- [52]Caprio F.Z., Sorond F.A. Cerebrovascular disease: primary and secondary stroke prevention // *Medical Clinics*. 2019 Mar 1. Vol. 103(2). P.295–308.
- [53]Yu D.R., Wang T., Huang J. MicroRNA-9 overexpression suppresses vulnerable atherosclerotic plaque and enhances vascular remodeling through negative regulation of the p38MAPK pathway via OLR1 in acute coronary syndrome // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2020. Vol. 121(1). P. 49–62.
- [54]Kim J.Y., Park J.T., Kim H.W., Chang T.I. et al. Inflammation Alters Relationship Between High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease: Results From KNOW-CKD // *Journal of the American Heart Association*. 2021. Vol. 10(16). P.217–231.
- [55]Lian Z., Zhu B., Lei C., Zhao W. et al. Reverse cholesterol transport-related miRNAs and their regulation by natural functional compounds // *Current Protein and Peptide Science*. 2019. Vol. 20(10). P.1004-1011.
- [56]Poznyak A.V., Kashirskikh D.A., Sukhorukov V.N. et.al. Cholesterol Transport Dysfunction and Its Involvement in Atherogenesis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23(3). P.13–32.
- [57]Kudinov V.A., Alekseeva O.Y., Torkhovskaya T.I., Baskaev K.K., Artyushev R.I., Saburina I.N., Markin S.S. High-density lipoproteins as homeostatic nanoparticles of blood plasma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21(22). P.30–37.
- [58]Santhi Priya S., Kumar Ebenezer K. Diabetes and Cardiovascular Disorder // In *Advances in Diabetes Research and Management*. Singapore: Springer Nature Singapore. 2023. P. 41-61.
- [59]Almourani R., Chinnakotla B., Patel R., Kurukulasuriya L.R., Sowers J. Diabetes and cardiovascular disease: an update // *Current diabetes reports*. 2019.19. P.1–3.

- [60]Opoku S., Gan Y., Yobo E.A., Tenkorang-Twum D., Yue W., Wang Z., Lu Z. Awareness, treatment, control, and determinants of dyslipidemia among adults in China // Scientific Reports. 2021 May 12. Vol.11(1). P.100-110.
- [61]Anagnostis P., Bitzer J., Cano A., Ceausu I., Chedraui P., Durmusoglu F., Erkkola R., Goulis D.G., Hirschberg A.L., Kiesel L., Lopes P. Menopause symptom management in women with dyslipidemias: an EMAS clinical guide. Maturitas. 2020. Vol.135. P.82–88.
- [62]Doré I., Plante A., Bedrossian N., Montminy S., St-Onge K., St-Cyr J., Pomey M.P., Charpentier D., Pettigrew L., Brisson I., Saad F. Developing practice guidelines to integrate physical activity promotion as part of routine cancer care: a knowledge-to-action protocol // Plos one. 2022. Vol.17(8). P.145.
- [63]Roux C.W., Fils-Aimé N., Camacho F., Gould E., Barakat M. The relationship between early weight loss and weight loss maintenance with naltrexone-bupropion therapy // Eclinicalmedicine. 2022 Jul 1. Vol.49. P.101–136.
- [64]Abdul-Rahman T., Bukhari S.M., Herrera E.C., Awuah W.A., Lawrence J., de Andrade H., Patel N., Shah R., Shaikh R., Capriles C.A., Ulsan S. Lipid Lowering Therapy: An Era Beyond Statins // Current Problems in Cardiology. 2022. P.101–342.
- [65]Dubieńska-Magiera M., Migocka-Patrzałek M., Lewandowski D., Daczeńska M., Jagla K. Zebrafish as a model for the study of lipid-lowering drug-induced myopathies // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22(11). P.54–56.
- [66]Nurmohamed N.S., Navar A.M., Kastelein J.J. New and emerging therapies for reduction of LDL-cholesterol and apolipoprotein B: JACC focus seminar ¼ // Journal of the American College of Cardiology. 2021 Mar 30. Vol.77(12). P.1564–1575.
- [67]Dong T.A., Sandesara P.B., Dhindsa D.S. et al. Intermittent fasting: a heart healthy dietary pattern // The American journal of medicine. 2020. Vol. 133(8). P. 901–907.

И. Х. Х. ИЛЬЯС

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДИСЛИПИДЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», Гродно, Республика Беларусь

Резюме

Целью данного литературного обзора является оценка биохимических показателей дислипидемии у людей с сахарным диабетом II типа и ее последствий. Используя базы данных Google Scholar, Web of Science и PubMed, мы провели систематический обзор. Мы искали статьи, опубликованные в период с 2018 по 2023 год. Критерии поиска включали «дислипидемию», «сахарный диабет II типа», «биохимические параметры» и «осложнения». В наш обзор вошли исследования биохимических особенностей дислипидемии у больных СД2 и его последствий. Всего поиск выдал 682 статьи, 404 статьи из Google Scholar, 258 статей из Web of Science и 20 статей из PubMed. Результаты выявили связь между СД2 и дислипидемией, исследование также выявило повышенный уровень липопротеинов низкой плотности, триглицеридов и повышенный уровень маркеров воспаления. СД2 по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы был связан с высокими уровнями липопротеинов низкой плотности – более 200 мг/дл, триглицеридов – более 400 мг/дл, холестерина – более 300 мг/дл.

Ключевые слова: сахарный диабет II типа, сердечно-сосудистые заболевания, биохимические показатели, дислипидемия.

УДК 616.594.14:616.379-008.64

Е. В. ЛЕМЕШКО¹, А. И. ШАРКО²

АНДРОГЕННАЯ АЛОПЕЦИЯ У ЖЕНЩИН: ПАТОГЕНЕЗ И РОЛЬ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Общество с ограниченной ответственностью «Гравитадиагностик», Минск, Республика Беларусь

В представленной статье обобщены современные представления об этиологии, патогенезе, особенностях клинических проявлений андрогенной алопеции (АА). Проведен анализ механизмов возникновения и роли инсулинорезистентности в развитии заболевания, разобраны значимые факторы, контролирующие цикл роста волоса фолликула при андрогенной алопеции. Рассмотрены современные методы диагностики и терапии АА.

Ключевые слова: андрогенная алопеция, инсулинорезистентность, алопеция у женщин, рецепторы андрогенов.

Введение. Одним из самых актуальных направлений в современной дерматологии и косметологии является изучение этиологии и патогенеза андрогенной алопеции (АА) и совершенствование методов лечения выпадения волос. Патогенез алопеции неоднороден и существующие теории патофизиологических процессов не полностью раскрывают механизмы выпадения волос, чем и обусловлен повышенный интерес ученых к этой проблеме.

Волосы играют большое значение в жизни человека, влияя как на самооощущение человека, так и на социальные взаимоотношения. Согласно исследованиям 50 % лиц мужского пола к 50 годам подвержены данному заболеванию [45]. У женщин АА встречается реже и к 30 годам это состояние отмечается у 2–5 % женщин, а к 70 годам – увеличивается до 40 %. Реальный процент заболеваемости недостаточно изучен, так как пациенты, считая повышенное выпадение волос вариантом нормы, не всегда обращаются за медицинской помощью в дебюте заболевания. На приеме врач в большинстве случаев видит состояние с выраженными эстетическими изменениями, когда становится заметным расширение пробора и кожа головы заметно просвечивает через волосы.

Впервые термин «андрогенетическая алопеция» в современном его понимании ввел американский дерматолог и разработчик методики пересадки волос Норман Орендтрайх в 1988 году. Этим термином он обозначил заболевание, характеризующееся прогрессирующим поредением и истончением волос как у мужчин, так и у женщин. В современном мире андрогенная алопеция описывается как заболевание, обусловленное генетической предрасположенностью и влиянием андрогенов (дигидротестостерона, ДГТ), возникает еще в период полового созревания, становится клинически значимой в возрасте 20–45 лет и продолжается всю жизнь. Действие андрогенов на волоса фолликул осуществляется локально посредством увеличения плотности рецепторов.

Нарастающая потеря волос у женщин при АА формируется в результате постепенного превращения терминальных фолликулов крупных пигментированных волос в андрогензависимых зонах в мелкие фолликулы, образующий тонкие, гипопигментированные волосы под влиянием мужских половых гормонов [49].

Согласно многочисленным исследованиям, существует прямая связь между облысением и содержанием макро- и микроэлементов в организме человека (их избыток, дефицит или дисбаланс) [40], нарушениями в гормональном статусе и метаболизмом веществ. Также существуют исследования [1], связывающие активацию инсулином андрогенных рецепторов с потерей волос у женщин. Практически замечено [6], что женщины в меньшей мере отвечают на терапию АА ингибиторами 5-альфа-редуктазы, которая предотвращает превращение тестостерона в более активный дигидротестостерон. Согласно этим наблюдениям, можно предположить, что в этих случаях определяющее влияние имеет не уровень андрогенов, а повышенная чувствительность фолликулов к ним. Изучение роли метаболических нарушений в развитии андрогенной алопеции актуально и имеет важное научно-практическое значение.

Анатомические особенности и жизненный цикл волоса фолликула. Составляющие волос части включают соединительнотканное влагалище, наружное и внутренне корневые влагалища, кутикулу, корковое и мозговое вещество. Важной зоной, ответственной за процессы регенерации и роста, является область волоса сосочка, который является продолжением соединительнотканного влагалища и состоит из функционально активных фибробластов, пучков коллагеновых волокон, аморфного вещества, нервных волокон и одиночной капиллярной петли. Именно из дермального сосочка происходят многие растворимые факторы роста, основным из которых является фактор роста кератиноцитов. Инъекции фактора роста кератиноцитов голым мышам вызывают усиленный рост волос в участках инъекций, что указывает на вероятную необходимость фактора роста кератиноцитов для роста волос и волоса цикла [7].

Основное количество волосных фолликулов (ВФ) закладывается внутриутробно и при рождении их количество максимальное из возможного в течение жизни человека. Несмотря на то, что морфогенетическое формирование ВФ происходит один раз в жизни, цикл его развития повторяется многократно (происходит волнообразная замена старых волос на новые). Каждый волосной фолликул в течение жизни проходит 10–30 циклов [51]. Циклическое функционирование волоса фолликула носит регулярный характер и состоит из трех фаз:

1) Анагена, активной фазы роста волоса фолликула, продолжительность которой идёт непрерывно и длится от 2 до 7 лет. Длительность анагена определяет окончательную длину волос и изменяется в зависимости от участка тела. В фазе анагена в клетках дермального сосочка активируются факторы роста, такие как инсулиноподобный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия сосудов и факторы роста стволовых клеток, которые паракринно влияют на фолликулярные кератиноциты и меланоциты;

2) Катагена, промежуточной короткой фазы инволюции, которая длится 10–14 дней и включает инволюцию волосных фолликулов вследствие апоптоза. В этой фазе происходит ингибирование факторов роста, таких как инсулиноподобный фактор роста, фактор роста сосудистого эндотелия, фактор роста фибробластов и активация трансформирующего фактора роста и фактора некроза опухоли, которые аутокринно или паракринно действуют на волосной фолликул;

3) Телогена или фазы покоя, которая длится примерно 100 дней, что приводит к соотношению анагеновых и телогеновых волос примерно 9:1. По сравнению с фазой анагена волос становится светлее, уменьшается в диаметре и, при достижении воронки фолликула, выпадает. В среднем количество новых волос на коже головы в норме практически совпадает с количеством, которое теряется из-за выпадения (примерно 100 в день), тем самым обеспечивается равномерное покрытие кожи головы [44].

4) Относительно недавно в научных трудах появилось упоминание о четвертой фазе «кеноген», которая характеризует длительный период после выпадения волоса, во время которого волосной фолликул остается в латентном состоянии. Некоторые авторы считают, что эта фаза является показательным признаком андрогенной алопеции [16].

Миниатюризация ВФ является отличительной чертой АА. Это происходит в какой-то момент между фазой позднего катагена и ранней фазой анагена, затрагивая дермальный сосочек и дермальную оболочку, что приводит к уменьшению фолликула и сокращению фазы анагена до нескольких недель или месяцев. Фаза телогена не претерпевает значительных изменений, однако возможно ее умеренное удлинение. Таким образом, при андрогенной алопеции соотношение фаз анагена и телогена изменяется до 5:1. В процессе миниатюризации фолликулов помимо уменьшения длины и истончения волоса наблюдается значительное увеличение размеров и активности андрогенчувствительных сальных желез, что проявляется в повышенной жирности кожи головы [23].

Влияние половых гормонов на развитие андрогенной алопеции описал еще Аристотель в четвертом веке, когда заметил, что ни дети, ни евнухи не лысеют. В 1942 г. Джеймс Гамильтон впервые научно описал значение андрогенов в развитии андрогенной алопеции, когда на основании своих клинических наблюдений описал следующие факты:

- у мужчин, больных евнухоидизмом или кастрированных в пубертантном возрасте, волосы на волосистой части головы остаются нетронутыми, интактными;

- у мужчин, кастрированных в возрасте 14–19 лет, волосы не выпадают или наблюдается лишь незначительное облысение;

- у мужчин, больных АГА, кастрированных в возрасте 20–43 года, дальнейшего прогрессирования заболевания не происходит;

- введение препаратов тестостерона может спровоцировать выпадение волос у евнухоидов и кастрированных мужчин с генетической предрасположенностью к АГА;
- прекращение введения тестостерона останавливает выпадение волос [17].

Андрогены циркулируют в крови в связанном виде, чаще всего с глобулином, связывающим половые гормоны (ГСПГ). Определено, что концентрация ГСПГ у женщин в 2 раза выше, чем у мужчин. Это связано с тем, что эстрогены стимулируют, а андрогены угнетают продукцию ГСПГ. Также депрессивным действием на уровень ГСПГ обладают недостаток тиреоидных гормонов, гиперинсулинемия (избыток инсулина подавляет продукцию ГСПГ в печени, тем самым повышая содержание в крови биологически активных фракций тестостерона) и избыток глюкокортикостероидов [52].

Установлено, что внутриклеточная концентрация андрогенов (особенно в андрогенчувствительных тканях) практически не зависит от циркулирующих уровней. Воздействие на ВФ происходит посредством активной формы мужского полового гормона тестостерона – дигидротестостерона (ДГТ). Превращение тестостерона в более мощный ДГТ происходит в предстательной железе, печени, головном мозге и коже под влиянием фермента 5-альфа-редуктазы в клетках дермального сосочка. 5-альфа-редуктазный дигидротестостерон связывается с рецептором андрогенов, после чего комплекс «гормон-рецептор» перемещается в ядро, где действует как фактор транскрипции, регулирующий экспрессию андроген-чувствительных генов факторов роста (инсулиноподобный фактор роста (ИФР) и прочие) [35]. Дигидротестостерон является внутриклеточным гормоном, имеет в пять раз более высокое сродство к рецептору андрогена и в 10 раз выше активность, чем тестостерон. Он активирует гены, отвечающие за миниатюризацию волосных фолликулов, в клетках дермального сосочка индуцирует секрецию факторов роста (трансформирующий фактор роста (ТФР) и другие), подавляющих рост и дифференцировку фолликулярных кератиноцитов, что и приводит к раннему наступлению фазы катагена [25]. Постепенное сокращение длительности стадии анагена обуславливает наличие тонких и коротких стержней волос у пациентов с АА.

Такой цикл реакций может быть вызван и менее активными андрогенами, к которым относится дегидроэпиандростерон (ДГЭА). ДГЭА имеет низкое сродство к андрогенным рецепторам, но под действием 5-альфа-редуктазы этот гормон может быть превращен в более активные метаболиты с высоким сродством к андрогенным рецепторам.

Антагонистом 5-альфа-редуктазы является фермент ароматаза, находящийся в клетках внутреннего и наружного корневого влагалища волосного фолликула. Разница клинической картины АА у мужчин и у женщин обусловлена наличием этого фермента. В затылочной области у мужчин и женщин и в лобной области у женщин находится более высокая концентрация ароматазы, которая преобразует в результате реакции ароматизации андрогены (тестостерон) в эстрогены (эстрадиол), что обуславливает отсутствие выпадения волос в этих областях. Эстрадиол оказывает обратные дигидротестостерону эффекты: стимулирует рост волос на голове, способствует увлажнению кожи, улучшает её текстуру и цвет [29].

Ответ волосных фолликулов на действие андрогенов изменяется в зависимости от участка тела. Так, фолликулы, расположенные в области подбородка, подмышечных впадин и лобка, увеличиваются в размерах, что известно, как «андрогенный парадокс», фолликулы теменной зоны волосистой части головы уменьшаются (наблюдается миниатюризация), а волосные фолликулы бровей и ресниц не претерпевают никаких изменений [43].

Исходя из этих данных следует, что для развития андрогенной алопеции необходимо наличие одного из тех факторов:

- повышение количества андрогенов в сыворотке крови;
- повышение количества андрогенных рецепторов;
- повышение уровня 5-альфа-редуктазы.

Клинические особенности АА у женщин. Существуют различия в клинической картине АА у женщин и мужчин, так как в волосных фолликулах у женщин в области лба на 40 % меньше андрогеновых рецепторов [33] и в 3 раза меньше фермента 5-альфа-редуктазы. АА у женщин прогрессирует медленнее, чем у мужчин, отличается характерным диффузным поредением волос, а не облысением в определенных местах. У мужчин активность 5-альфа-редуктазы в коже лобной области в два раза выше, чем в области затылка; активность ароматазы в обеих областях минимальна. У женщин активность 5-альфа-редуктазы в лобно-теменной области также в два раза выше, но общее количество этого фермента у женщин в два раза меньше, чем у мужчин [36]. Сохранение передней

линии волос у большинства женщин с АА можно объяснить высокой активностью ароматазы, конвертирующей андрогены в эстрогены, которые обладают антиандрогенным действием благодаря своей способности повышать уровень белков, связывающих половые гормоны.

У женщин АА может развиваться согласно трем моделям:

1. Модель Людвига. Характеризуется диффузной потерей волос в теменной области и персистирующей фронтальной линией роста волос. Классификация по Людвигу [10] включает три типа облысения, отражающих клинические стадии прогрессирующей АА у женщин:

- 1 степень – заметное истончение волос в пределах лобно-теменной зоны, расширение пробора, но краевая линия роста волос остается сохранной;
- 2 степень – выраженное разрежение волос в пределах лобно-теменной зоны;
- 3 степень – в пределах лобно-теменной зоны волосы полностью утрачены. Встречается менее, чем у 5 % женщин, страдающих андрогенной алопецией. Следует отметить, что у женщин с облысением по мужскому типу не может быть выставлена стадия по классификации Людвига.

2. Модель Гамильтона. Характеризуется битемпоральными залысинами, чаще наблюдается у женщин в менопаузе и у женщин с гиперандрогенией. Согласно наблюдениям J. Hamilton [18] частота АА у женщин зависит от возраста и появление глубоких лобно-височных залысин по мужскому типу с некоторой потерей границы волос в среднефронтальной части скальпа отмечается у 19 % женщин в возрасте до 50 лет.

3. Модель Олсена или «рождественской елки». Вариант потери волос, при котором облысение постепенно формируется вдоль центрального пробора с преимущественным разрежением волос по направлению ко лбу, и это явление также называют «фронтальным акцентированием». E. Olsen [31] отмечает частичную потерю волос по женскому типу по большей части в лобной части с сохранением границы роста волос на лбу у 48 % женщин в возрасте 15–70 лет.

Методы диагностики андрогенной алопеции. Современными диагностическими методами являются трихоскопия, фототрихография и биопсия. Для неинвазивной диагностики исследования кожи волосистой части головы используют метод трихоскопии, основанный на методе дерматоскопии. Метод был разработан группами дерматологов под руководством Лидии Рудницкой из Польши, Антонеллы Тости и Джузеппе Микали из Италии и Шигеки Инуи из Японии. При трихоскопии, даже на ранних стадиях андрогенной алопеции, АА характеризуется прогрессирующей миниатюризацией фолликулов. Также наиболее ранним диагностическим признаком АА считается разность диаметров стержней волос более 20 % [15].

Специфическим трихоскопическим признаком АА является перипилярный знак, обнаруживаемый на ранних стадиях патологического процесса. Он представляет собой коричневое кольцо вокруг волосного фолликула около 1 мм в диаметре и отражает процесс перифолликулярного лимфоцитарного воспаления. В случаях длительно текущей АА на коже волосистой части головы можно наблюдать жемчужно-белые папулы, которые представляют собой сальные железы, гипертрофированные вследствие нарушения чувствительности к циркулирующим андрогенам [34]. При трихоскопии важно определить соотношение телогеновых и анагеновых волос, терминальных и пушковых волос. При андрогенной алопеции диагностическим критерием является соотношение терминальных волос к пушковым 4:1. Еще одним трихоскопическим признаком АА считаются пустующие фолликулы. Они отражают период физиологического цикла развития фолликулов, наступающий после окончания телогена и до наступления анагена.

Таким образом, использование трихоскопии кожи волосистой части головы упрощает и ускоряет диагностику АА, в том числе дифференциальную диагностику с другими типами облысения, позволяет определить степень тяжести, а также обеспечивает динамический контроль заболевания и оценку эффективности лечения.

Метод фототрихограммы позволяет неинвазивно исследовать цикл роста волос *in vivo* и проводить измерения его параметров [21] (диаметр, плотность, количество пушковых волос, процент волос, находящихся в различных стадиях роста, среднюю скорость роста и прочие). С помощью фототрихограммы можно наблюдать выпадение волос в динамике и осуществлять дифференциальную диагностику с другими видами алопеции.

В некоторых случаях может потребоваться биопсия кожи головы для проведения дифференциального диагноза телогенного выпадения волос и андрогенной алопеции, а также углубленного понимания патофизиологии текущего процесса. Биопсия кожи проводится на границе сформировавшегося очага и зоны расшатанных волос. Следует избегать проведения биопсии в

височных областях, так как на этих участках высока вероятность обнаружения миниатюризированных фолликулов даже в отсутствие АА [3].

Специфические гистопатологические особенности андрогенной алопеции позволяют успешно дифференцировать АА от других видов алопеции. Отношение терминальных волос к тонким, «пушковым» в биоптате 3:1 и менее является диагностическим критерием андрогенной алопеции. Известно, что миниатюризация терминальных волос наблюдается при АА, но невозможна при очаговой алопеции [26]. Характерным гистологическим признаком АА является наличие умеренного фиброза вокруг верхней части фолликула [9]. Почти в половине случаев при гистологическом исследовании наблюдаются перифолликулярные отложения коллагена и утолщение корневого влагалища волоса [13]. Также определяется перифолликулярный лимфоцитарный воспалительный инфильтрат вокруг воронки волоса, но это не является специфическим признаком АА, так как может наблюдаться у людей, не страдающих облысением.

Инсулинорезистентность и АА. Инсулинорезистентность (IR) определяется как неспособность известного количества экзогенного и эндогенного инсулина регулировать транспорт глюкозы в тканях. Развивающаяся IR сопровождается гиперинсулинемией, которая обеспечивает поддержание эффективности углеводного обмена и обеспечивает адекватной митогенной активности жизнедеятельности и деления клеток.

В ряде исследований была обнаружена связь между андрогенной алопецией и увеличением индекса массы тела и окружности талии пациентов [27, 14, 48]. Группа ученых сравнили 41 женщину с андрогенной алопецией и 25 здоровых женщин на предмет инсулинорезистентности. При этом участницы исследования не страдали ожирением. В результате исследования было обнаружено преобладание инсулинорезистентности у женщин с АА [12].

Инсулин, обнаруживаемый в волосяных фолликулах, принимает участие в регуляции метаболизма андрогенов и цикла роста волос [30]. Предполагается, что вазоактивные вещества, ассоциированные с эндотелиальной дисфункцией, развивающейся в следствие инсулинорезистентности, приводят к нарушению микроциркуляции в волосяной луковице, так как способствуют сужению сосудов и пролиферации гладкомышечных клеток в его стенке. Это приводит к тканевой гипоксии и способствует трансформации терминальных волосяных фолликулов в миниатюризированные [28]. Кроме того, гиперинсулинемия способствует местному синтезу андрогенов: это может быть синтез дигидротестостерона из тестостерона или синтез андрогенов *de novo* из холестерина [19]. Также инсулинорезистентность обуславливает активацию синтеза медиаторов воспаления, что опосредованно может влиять на развитие, прогрессирование и тяжелое течение АА [20].

Повышенная концентрация инсулина приводит к повышению секреции инсулиноподобного фактора роста (ИФР-1) печенью. ИФР-1 влияет на пролиферацию фолликула, тканевое ремоделирование и цикл роста волос. В исследовании J. Li (2014) продемонстрировано, что экзогенный ИФР-1 продлевает фазу анагена и увеличивает количество волосяных фолликулов у мышей в естественных условиях. У мышей, которым был введен препарат ИФР-1, происходило дозозависимое уменьшение экспрессии трансформирующего фактора роста (ТФР), который в свою очередь является мощным ингибитором роста различных типов клеток, в том числе эпителиальных клеток. У мышей с дефицитом ТФР отмечалось значительное увеличение продолжительности фазы анагена, а у мышей с отсутствием ТФР было показано значительное увеличение количество пролиферирующих и низкий уровень апоптотических клеток в волосяном фолликуле в фазе анагена и в начале фазы катагена. ТФР ингибирует рост волос за счет сокращения фазы анагена и запуска раннего вступления фолликула в фазу катагена [42].

Еще одно исследование показало, что ИФР-1 увеличивает стимуляцию андрогензависимых рецепторов (АР), с участием фактора транскрипции FoxO1. В ядре клетки FoxO1 действует как ко-супрессор АР. Инсулин и ИФР-1 катализируют фосфорилирование FoxO1 посредством Akt-киназы. Фосфорилированные FoxO1 становятся более растворимыми и покидают ядро, попадая в цитоплазму, где происходит их разрушение. Фосфорилирование и дальнейшее разрушение FoxO1 способствует активации АР [8]. Такие механизмы открывают новые возможности для исследования андрогенной алопеции у женщин, так как потеря волос по женскому типу не всегда связана с повышением уровня андрогенов.

Методы медикаментозного лечения АА у женщин. Для лечения андрогенной алопеции применяют препараты как наружного, так и системного действия. Единственным лекарственным препаратом с доказанной эффективностью для стимуляции роста волос путем наружного нанесения

является миноксидил. Механизм действия миноксидила до конца не изучен, но имеются публикации о его стимулирующем влиянии и пролонгировании стадии анагена по средством активации калиевых каналов клеточных мембран, вызывая вазодилатацию [39]. Регулярное применение препаратов, содержащих 2 % миноксидил, в 30–35 % случаев частично восстанавливает восстанавливает миниатюризированные фолликулы, продлевает фазу анагена и укорачивает период телогена. В течение 1 месяца после начала терапии часть пациентов отмечает усиленное выпадение волос, которое быстро останавливается при продолжении применения препарата. Этот процесс отражает стимуляцию перехода волосных фолликулов из фазы телогена в фазу анагена [38]. В ряде случаев применение миноксидила может сопровождаться зудом и сухостью кожи головы, аллергическим контактным дерматитом и гипертрихозом. Оценку эффективности применения миноксидила у пациентов с андрогенной алопецией следует проводить через 6 месяцев после начала лечения. При положительном эффекте необходимо продолжить лечение [46].

Для системной терапии андрогенной алопеции применяют средства, которые блокируют связывание тестостерона и/или дигидротестостерона с рецепторами андрогена. В основе терапевтического эффекта препаратов лежат механизмы [2], снижающие синтез андрогенов в яичниках или надпочечниках, тормозящие пути образования активного дигидротестостерона из тестостерона путем подавляющего воздействия на фермент 5-альфа-редуктазу, а также конкурентное связывание с андрогенными рецепторами. К ним относятся такие препараты, как комбинированные оральные контрацептивы с антиандрогенным действием, спиронолактон, флутамид, финастерид и дутастерид. Эти препараты имеют ряд побочных эффектов, таких как нарушение менструального цикла, депрессия и заболевания молочных желез.

Эффективным препаратом для лечения андрогенной алопецией у женщин является ципротерона ацетат, который является производным 17-альфа-гидроксипрогестерона и отличается сильным антиандрогенным действием, блокирует андрогенные рецепторы, снижает уровень тестостерона [22]. Женщинам репродуктивного возраста назначается в комбинации с этинилэстрадиолом. Длительность терапии андрогенной алопеции зависит от степени тяжести заболевания и продолжается 9–12 месяцев или до возобновления роста волос. В ряде исследований показано, эффективность препарата в лечении андрогенной алопеции выражена у пациенток с выявленной гиперандрогемией, при ее отсутствии наружная терапия 2 % раствором миноксидила является более предпочтительной [47].

Спиронолактон успешно применяется в лечении андрогенной алопеции у женщин, но не используется у мужчин в связи с риском развития гинекомастии, снижения либидо и потенции [37]. Спиронолактон изменяет в организме соотношение женских и мужских половых гормонов, влияет на синтез стероидов, метаболизм тестостерона [5]. Главным компонентом антиандрогенного действия спиронолактона является его способность блокировать рецепторы мужских половых гормонов. Он способен избирательно ингибировать андрогенные рецепторы на мембране клеток, что было обнаружено при исследовании вентрального отдела предстательной железы крыс и тканей человека [11]. Также периферическое действие спиронолактона дополняется его влиянием на 5-альфа-редуктазу. Значительное снижение скорости образования дегидротестостерона в крови наблюдается у женщин с идиопатическим гирсутизмом и синдромом поликистозных яичников, принимавших спиронолактон в течение месяца с хорошим терапевтическим эффектом [24].

Флутамид является нестероидным антиандрогенным средством, механизм действия которого осуществляется через антагонизм с андрогеновыми рецепторами. Препарат блокирует взаимодействие андрогенов с их клеточными рецепторами и обладает способностью препятствовать действию тестостерона на клеточном уровне. В рандомизированном исследовании ученые выявили большую эффективность флутамида по сравнению с финастеридом и ципротерона ацетатом после 1 года лечения андрогенной алопеции у женщин [4].

Имеются лишь единичные публикации о возможности использования финастерида у женщин для лечения андрогенной алопеции. Финастерид является специфическим ингибитором 5-альфа-редуктазы и действует путем снижения перехода тестостерона в дигидротестостерон примерно на 64 % [50]. Применение финастерида у женщин с андрогенной алопецией в постменопаузальном периоде в дозировке 1 мг в сутки не показало эффективности в клинических исследованиях [32]. В других работах на малочисленных группах пациенток в постменопаузальном возрасте был описан положительный результат применения финастерида в дозировке 1–5 мг в сутки [41].

В настоящее время не все вышеуказанные препараты разрешены к применению в Республике Беларусь и ряде других стран. Так как патогенетические механизмы возникновения андрогенный

алопеции недостаточно изучены, эффективность используемых методов терапии невысока и, как правило, носит временный характер.

Заключение. Андрогенная алопеция является мультифакторным заболеванием, в основе которого лежат:

- избыточное содержание в тканях организма андрогенов;
- повышенная чувствительность андрогенных рецепторов к ним;
- локальное тканевое нарушение метаболизма андрогенов;

Андрогены, воздействуя на волосяные фолликулы кожи волосистой части головы, приводят к их миниатюризации и развитию клинической картины андрогенной алопеции.

Инсулин и инсулиноподобный фактор роста-1 могут повышать уровень дигидротестостерона (ДГТ), индуцируя активность 5-альфа-редуктазы. Также инсулинорезистентность может быть патогенетическим механизмом или усиливающим фактором в развитии андрогенной алопеции.

Лечение андрогенной алопеции у женщин заключается в нормализации гормонального статуса и назначении препаратов, тормозящих превращение тестостерона в дигидротестостерон.

Для разработки дифференцированных подходов к назначению различных видов терапии необходимо дальнейшее изучение патогенеза андрогенной алопеции и выявление возможных генетических маркеров повышенной чувствительности к андрогенам.

Литература:

- [1] *Misitzis A. et al.* Skin diseases related to metabolic syndrome in women // *Int. J. Womens Dermatol.* 2019. Vol. 5, № 4. P. 205–212.
- [2] *Blake H. Salisbury et al.* 5-Alpha-Reductase Inhibitors. In: StatPearls Publishing; 2024 Jan.
- [3] *Blume-Peytavi U. et al.* S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescents. // *Br. J. dermatol.* 2011. T. 164. № 1. C. 5–15.
- [4] *Carmina E., Lobo N.* Treatment of hyperandrogenic alopecia in women // *Fertil. Steril.* 2003. Vol. 79. P. 91–95.
- [5] *Clark E.* // *J. A. M. A.* 1965. Vol. 193. P. 163–164.
- [6] *Whiting D.A. et al.* Measuring reversal of hair miniaturization in androgenic alopecia by follicular counts in horizontal sections of serial scalp biopsies: results of finasteride 1 mg treatment of men and postmenopausal women // *J. Invest. Dermatol. Symp.Proc.* 1999. Vol. 4, №3. P. 282–284.
- [7] *Danilenko D.M. et al.* Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 147, № 1. P. 145–54.
- [8] *Danaela V. et al.* FOXO1 is Regulated by insulin and IGF1 in Pituitary Gonadotropes. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015. Vol. 5, № 405. P. 14–24.
- [9] *Deloche C. et al.* Histological features of peripilar signs associated with androgenetic alopecia // *Arch. Dermatol. Res.* 2004. T. 295. C. 422–428.
- [10] *Ludwig E.* Classification of the types of androgenic alopecia (common baldness) occurring in the female sex // *Br. J. Dermatol.* 1977. Vol. 97, № 3. P. 247–54.
- [11] *Eil Ch., Edelson E.* The use of human skin fibroblasts to obtain potency estimates of drug binding to androgen receptors // *J. Clin. Endocr.* 1984. Vol. 59, № 1. P. 51–53.
- [12] *Ekmekçi, T.R.* The presence of insulin resistance and comparison of various insulin sensitivity indices in women with androgenetic alopecia // *Eur. J. Dermatol.* 2007. 17. P. 21–25.
- [13] *El-Domyati M. et al.* Androgenetic alopecia in males: a histopathological and ultrastructural study. // *J. Cosmet. Dermatol.* 2009. T. 8, № 2. C. 83–91.
- [14] *Agaolu E. et al.* Prevalence of early-onset androgenetic alopecia and its relationship with lifestyle and dietary habits // *Ital. J. Dermatol venerol.* 2021. Vol. 156, № 6. P. 675–680.
- [15] *Galliker N.A., Trueb R.M.* Value of trichoscopy versus trichogram for diagnosis of female androgenetic alopecia. // *Int. J. Trihology.* 2012. T. 4, № 1. C. 19–22.
- [16] *Guarrera M., Rebora A.* Kenogen in female androgenetic alopecia. A longitudinal study // *Dermatology.* 2005. Vol. 210, № 1. P. 18–20.
- [17] *Hamilton J.B.* Male Hormone Stimulation is a Prerequisite and Incitant in Common Baldness // *J. Invest. Dermatol.* 1942. T. 5, № 6. C. 473–474.
- [18] *Hamilton J.B.* Patterned loss of hair in man: types and incidence // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1951. Vol. 53. P.708–728.
- [19] *Horton R.* Androgen induction of steroid 5 α -reductase may be mediated via insulin-like growth factor 1 // *Endocrinology.* 1993. Vol. 133. P. 447–451.
- [20] *James I.* Expert Panel on Detection, Evolution and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults // *JAMA.* 2001. Vol. 285, № 19. P. 2486–2497.
- [21] *EunKim J. et al.* Phototrichogram analysis of normal scalp hair characteristics with aging // *Eur. J. Dermatol.* 2013. Vol. 23, № 6. P. 849–56.

- [22]Kelekci K.H., Kelekci S. Cyproterone acetate or drospirenone containing combined oral contraceptives plus spironolactone or cyproterone acetate for hirsutism: randomized comparison of three regimens // J. Dermatolog. Treat. 2012. Vol. 23, № 3. P. 177–183.
- [23]Kligman A.M. The comparative histopatology of male-pattern baldness and senescent baldness // Clin. Dermatol. 1988. T. 6, № 4. C. 108–18.
- [24]Kuramoto H., Kumazawa J. Ultrastrukturnal studies of adrenal adenoma causing primary aldosteronism // Virch. Arch. Abt. A. Path. Anat. 1985. Vol. 407, № 3. P. 271–278.
- [25]Kwak M.H., Sung Y.K., Chung E.J., et al. Dihydrotestosterone-inducible dickkopf 1 from badding dermal papilla cells causes apoptosis in follicular keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2008. P. 262–269.
- [26]Li J., Yang Z., Li Z. et al. Exogenous IGF-1 promotes hair growth by stimulating cell proliferation and down regulating TGF-1 in C57BL/6 mice in vivo // Growth Hormone and IGF Research. 2014.P. 89–94.
- [27]Matilainen V., Koskela S., Keinanen-Kiukaanniemi P. Early androgenetic alopecia as a marker of insulin resistance // Lancet. 2000. Vol. 356, № 9236. P.1165–1166.
- [28]Matilainen V. et al. Hair loss, insulin resistance, and heredity in middleaged women. A population-based study // J. Cardiovasc. Risk. 2003. Vol. 10, № 3. P. 227–231.
- [29]Grymowicz M. et al. Hormonal Effects on Hair Follicles // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, № 15. P. 5342.
- [30]Nabaie L. et al. Androgenetic alopecia and insulin resistance: Are they really related? // Clin. Exp. Dermatol. 2009. Vol. 34, Is.6. P. 694–697.
- [31]Olsen E.A. The midline part: an important physical clue to the clinical diagnosis of androgenetic alopecia in women // J. Am. Acad. Dermatol. 1999. Vol. 40. P. 106–110.
- [32]Price V.H., Roberts J.L., Hordinsky M. et al. Lack of efficacy of finasteride in postmenopausal women with androgenic alopecia // J. Am. Acad. Dermatol. 2000. Vol. 43. P. 768–776.
- [33]Quigley C.A. The androgen receptor: physiology and pathophysiology // Testosteron: Action, Deficiency, Substitution / Eds E. Nieschlag, H.M. Behre.1998. P. 33–106.
- [34]Rakowska A. et al. Dermatoscopy in female androgenetic alopecia: method standardization and diagnostic criteria. // Int. J. Trihology. 2009. T. 1, № 2. C. 121–30.
- [35]Randall V.A. The role of 5a-reductase in health and disease // Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism. Hormones, Enzymes and Receptors/ Eds M. Sheppard, P. Steward. 1994. Vol. 8. P.405–431.
- [36]Randall V.A. The role of 5a-reductase in health and disease // Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism. Hormones, Enzymes and Receptos / Eds M. Sheppard, P. Steward. 1994. Vol.8. P. 406–431.
- [37][37]. Rathnayake D., Sinclair R. Innovative use of spironolactone as an antiandrogen in the treatment of female pattern hair loss // Dermatol. Clin. 2010. Vol. 28, № 3. P. 611–618.
- [38]Rathnayake D., Sinclair R. Male androgenetic alopecia. // Expert Opin. Pharmacother. 2010. T. 11, № 8. C. 1295–1304.
- [39]Ruchy J., De-Eknankul W. Potential targets in the discovery of new hair growth promoters for androgenic alopecia // Expert Opin. Ther. Targets. 2014. Vol. 18, №7. P. 787–806.
- [40]Rushton D.H. Nutritional factors and hair loss // Clin. and experim. dermatology. 2002. Vol. 121, № 5. P. 396–401.
- [41]Shum K.W., Cullen D.R., Messenger A.G. Hair loss in women with hyperandrogenism: four cases responding to finasteride // J. Am. Acad. Dermatol. 2002. Vol. 47, № 5. P.733–739.
- [42]Sinclair R, Torkamani N, Jones L. Androgenetic alopecia: new insights into the pathogenesis and mechanism of hair loss // F1000Res. Vol. 4, № F1000 Faculty Rev. P. 586.
- [43]Sinclair R.D. Male androgenetic alopecia (part 2) // J. Man Heal. Gend. 2005. T. 2, № 1. C. 38–44.
- [44]Stought D. et al. Psychological effect, pathophysiology, and management of androgenetic alopecia in men. Mayo Clin Proc. 2005. Vol.80, № 10. P. 1316–1322.
- [45]Trueb R.M. Molecular mechanism of androgenetic alopecia. Exp. Gerontol. 2002. Vol. 37, № 8-9. P. 981–990.
- [46]Trueb R.M., Lee W.S. Male alopecia: Guide to Successful Management. Springer International Publishing AG, 2014. 283 p.
- [47]Vexiau P. et al. Effects of minoxidil 2 % vs cyproteron acetate treatment on female androgenetic alopecia: A controlled, 12-month randomized trial // Br. J. Dermatol. 2002. Vol. 146, № 6. P. 992–999.
- [48]Yueqi qiu et al. Systematic Reviw and Meta-analysis of the Association Between Metaboluc Syndrome and Androgenetic Alopecia //Acta. Derm. Venerol. 2022. Vol. 8, № 102. P. adv00645.
- [49]Вольф К. Лоуэлл А. Голдсмит, Кац И. Дерматология Фицпатрика в клинической практике. М.: Бином. 2012. Т. 1. С. 807–815.
- [50]Кардашова Д.З. и др. Комплексный подход – основа эффективного лечения алопеции // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2012, № 1. С. 58–63.
- [51]Мяделец О.Д., Адашкевич В.П. Морфофункциональная дерматология. М.: Медлит, 2006. 752 с.
- [52]Пищулин, А.А. Диагностика и лечение овариальной гиперандрогении: Автореф. дис... канд. мед. наук. – М., 1999. 20 с.

Y. V. LEMESHKO¹, A. I. SHARKO²

ANDROGENIC ALOPECIA IN WOMEN: PATHOGENESIS AND ROLE OF INSULIN RESISTANCE

¹ *State Scientific Institution "Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus*

² *Limited Liability Company "Gravitadiagnostic", Minsk, Republic of Belarus*

Summary

This paper summarises modern views on the etiology, pathogenesis and aspects of the clinical course of the androgenetic alopecia (AA). For the purposes of writing this paper, there has been a detailed analysis of the mechanisms of the occurrence and development of the disease and the key factors that control the hair follicle growth cycle in androgenic alopecia have been considered. Finally, this paper describes modern methods of diagnostics and complex pharmacological correction of AA.

Key words: androgenic alopecia, insulin resistance, alopecia in women, androgen receptors.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

ТЕМАТИКА

Журнал **Новости медико-биологических наук (News of Biomedical Sciences)** публикует результаты экспериментальных клинических и теоретических исследований в областях физиологии и общей патологии; морфологии, нейрохимии; биохимии и эндокринологии; фармакологии и токсикологии; вирусологии, микробиологии и иммунологии; медицинской биологии и медицинской генетики; биофизики, физической медицины и биомедицинских технологий.

Статьи издаются на белорусском, русском и английском языках.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ

Рекомендуемый размер статьи, включая указатель литературы, таблицы, иллюстрации и резюме, – 10–15 страниц «машинописного» текста (кегель 14 пт), распечатанных через два интервала, с полями слева не менее 2,5 см. **Статьи большего размера без предварительного согласования с Редакцией не принимаются.** Рекомендуемое число литературных ссылок для экспериментальной статьи – не более 25, для обзоров и проблемных статей – не более 75. Рекомендуемый размер обзора – 20–25 страниц «машинописного» текста.

Статьи следует представлять **в 2 экземплярах** с обязательным приложением электронной версии, сопроводительных документов от учреждения, где выполнена работа (по одному экземпляру акта экспертизы и направления от учреждения).

по адресу:

220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, Институт физиологии НАН Беларуси. Редакция журнала «Новости медико-биологических наук. News of Biomedical Sciences». Телефон: 8(017)379-17-82, 8(017)378-16-30 E-mail: journal@fizio.bas-net.by

Наличие электронной версии, направленной по электронной почте, не заменяет представления публикации в виде распечатки текста, рисунков в обычной форме и подписи соавторов статьи.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

Материалы должны быть представлены в следующем порядке и оформлены по следующим правилам, без соблюдения которых они рассматриваться не будут. Авторы несут ответственность за точность и достоверность предоставленных выходных и персональных данных, корректность их перевода на английский язык, за достоверность используемых научных материалов, точность цитат, правильность ссылок на них.

Информационный лист

Представленные материалы предваряют информационным листом. На нем указывают название работы, инициалы и фамилии авторов, полное название учреждения, откуда выходит работа.

Информационный лист должен быть подписан всеми авторами. На нем следует указать их адреса, номера телефонов и телефаксов, а также адреса электронной почты (E-mail), фамилии, имена и отчества авторов (полностью), ученые степени и звания. Отдельно следует пометить координаты того автора, с которым редакция сможет при необходимости связаться.

На информационном листе обязательно следует указать рубрику для помещения публикации в журнале.

Основной текст статьи

Начало статьи должно быть оформлено по следующему образцу:

Индекс статьи по Универсальной десятичной классификации (УДК); Авторы; Название; Полные названия учреждений, в которых выполнялось исследование. Если статья написана авторами из разных учреждений, это должно быть отмечено верхними цифровыми индексами. Например:

УДК 612.337

И. И. ИВАНОВ¹, П. П. ПЕТРОВ^{1,2}

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

¹ Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Статья должна быть написана лаконично и четко. В рукописи (распечатке) на левом поле карандашом отмечается место, где должен быть помещен рисунок (таблица). Ссылки на литературу в тексте даются в квадратных скобках арабскими цифрами – [1–3, 5]. Формулы указываются в тексте четко, с аккуратным обозначением индексов. Особенно тщательно следует указывать знаки, сходные по начертанию. Ферменты при первом упоминании должны обозначаться полным названием с цифровым индексом согласно Международной классификации ферментов (Комиссия по ферментам IUB). При повторном упоминании может применяться общепринятое тривиальное название. Автор(ы) гарантирует(ют), что эксперименты выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией о гуманном обращении с животными.

Редакция оставляет за собой право сокращать статьи.

Текст статьи должен содержать рубрики: введение, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение.

Резюме (Summary)

Резюме (на русском и английском языках отдельно), на 0,5 с. «машинописного» текста (не более 250 слов) должно быть выполнено в виде одного абзаца с указанием фамилии и инициалов авторов, заглавия статьи. В конце отдельной строкой следует указать не более шести ключевых слов.

Иллюстрации

К полноформатной статье может быть приложено не более 5 рисунков. Комбинирование в одном рисунке нескольких кадров, требующих изготовления разных клише (тоновые рисунки и графика), не допускается. Размер рисунков должен быть таков, чтобы в сумме они занимали не более 2 журнальных страниц формата А4. Максимальный размер рисунка не должен превышать 16 см (по ширине). Рисунки прикладываются в 2 экземплярах. Рисунки должны быть представлены в виде, исключающем их доработку. Графики должны быть распечатаны на лазерном принтере. На обороте каждого рисунка пишется карандашом фамилии авторов, номер рисунка, указывается верх рисунка, если правильное расположение его в тексте может вызвать затруднение. В подписях должен быть дан заголовок рисунка и расшифрованы буквенные и цифровые обозначения на нем, указана последовательность расположения иллюстративного материала и т.п. Для микрофотографий указывают увеличение, для электронограмм – масштаб. Прочие объяснения должны приводиться в тексте. Подписи к рисункам нужно печатать отдельно от основного текста статьи (на отдельных листах).

В электронной версии помимо размещения в статье, рисунки представляются в виде отдельных файлов в формате TIF или в форматах, созданных в пакетах Adobe PhotoShop, CorelDraw, Adobe Illustrator.

Таблицы

Таблицы должны быть отпечатаны через два интервала, иметь порядковые номера (арабские, например: табл. 1). Таблица должна иметь общий заголовок. Все графы без исключения должны иметь заголовки. Сокращения слов (кроме общепринятых) в таблицах не допускаются.

Текст статьи не должен дублировать содержание иллюстративного материала.

Список литературы должен быть оформлен на отдельном листе (листах) бумаги. Список составляется только по работам, цитированным в тексте. Все работы, упомянутые в тексте, должны быть включены в список.

Список литературы составляется в порядке упоминания источников.

Библиографические данные оформляются следующим образом:

1. Книга (монография), одностомное издание:

[1]. *Гурин В.Н.* Центральные механизмы терморегуляции. Мн.: Беларусь, 1980. 127 с.

2. Статья из книги:

[2]. *Властов Б.В., Матекин П.В.* Жизнь животных. М., 1988. Т. 2. С. 20–64.

[3]. *Moroz L.L.* Signal molecules and behaviour. Eds. W. Winlow, O.S. Vinogradova, D.A. Sakharov. Manchester: Manchester University Press, 1991. P. 101–123.

3. Статья из журнала:

[4]. *Katz B., Miledi R.* The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction // J. Physiol. 1965. Vol. 181. P. 656–670.

Номер журнала (через запятую после номера тома) необходимо указывать, только если нумерация страниц начинается в каждом номере.

4. Автореферат диссертации:

[5]. *Васим Т.В.* Транспорт нейротрансмиттеров в анизоосмотических условиях пресинаптическими нервными окончаниями мозга: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Мн.: Ин-т биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 2009. 23 с.

5. Тезисы доклада:

[6]. *Стукач Ю.П., Досина М.О., Тимошенко А.Х. и др.* // Интенсивность продукции монооксида азота в миокарде крыс после моделирования геморрагического и ишемического инсульта // сб. VI Всероссийской с международным участием школы-конференции. Москва. 2016. С.149–150.

За правильность и полноту представления библиографических данных редакция ответственности не несет.

Если по формальным признакам список составлен небрежно, статья возвращается для доработки.

ВСЕ ПРЕДСТАВЛЯЕМЫЕ НАУЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПОДВЕРГАЮТСЯ ОБЯЗАТЕЛЬНОМУ РЕЦЕНЗИРОВАНИЮ

Доработка

Для доработки в соответствии с замечаниями рецензента статья возвращается автору на срок не более трех месяцев. После доработки автор должен вернуть в редакцию и старый и доработанный варианты статьи. После доработки статья направляется на повторное рецензирование. Если через три месяца автор не возвратил доработанную статью, она исключается из редакционного портфеля.

Корректурa

Корректурa высылается автору *в случае необходимости* для исправления опечаток или искажений первоначального текста. Никакие изменения и дополнения не допускаются и в текст вноситься не будут. Корректурa, тщательно выверенная и подписанная автором, должна быть возвращена в редакцию не позднее двух суток со дня ее получения.

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2024, Т. 24, № 2

Набор и верстка *Чеботарь А.О., Филипович Т.А.*
Дизайн обложки *Саркисов С.В.*

Подписано в печать с готового оригинал-макета заказчика 17.06.2024. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 17,21. уч. изд. л. 16,5. Тираж 100 экз. Заказ 120.

Государственное научное учреждение «Институт физиологии НАН Беларуси».
ЛИ №02330/0494405 от 16.03.2009. Ул. Академическая, 28. 220072, г. Минск.

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП №02330/455 от 30.12.2013.
Ул. Ф. Скорины, 40. 220084, г. Минск.